

Optimización de fabricación de GL-2045, un stradomer multimerizante

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica prioridad con respecto a la solicitud provisional estadounidense n.º 62/432,402, presentada el 9 de diciembre de 2016, cuyo contenido se incorpora en la presente en su totalidad a modo de referencia.

DESCRIPCIÓN DEL ARCHIVO DE TEXTO PRESENTADO DE FORMA ELECTRÓNICA

El contenido del archivo de texto presentado electrónicamente con la presente se incorpora en la presente en su totalidad a modo de referencia: Copia en formato legible por computadora del Listado de secuencias (nombre del archivo: GLIK_017_01WO_ST25.txt; fecha de registro: 8 de diciembre de 2017, tamaño del archivo 15 kb).

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere, en general, a los campos de la inmunología, autoinmunidad, inflamación e inmunología tumoral. Más específicamente, la presente invención se refiere a métodos optimizados para fabricar GL-2045. La invención también se refiere a composiciones novedosas que comprenden este GL-2045 fabricado de forma óptima, así como métodos para usar las composiciones de GL-2045. La invención se refiere además a tratar o prevenir afecciones patológicas como enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La inmunoglobulina intravenosa humana agrupada (IVIG) se ha utilizado desde principios de 1950 para tratar trastornos de carencias inmunes y, más recientemente, enfermedades autoinmunes e inflamatorias. IVIG media los efectos inmunológicos tolerogénicos mediante varios mecanismos que incluyen la unión de agregados de IVIG a C1q de complemento y receptores Fc gamma (FcγRs) y la reticulación de estos receptores de células inmunes como células NK (por ej., FcγRIIIa), macrófagos (por ejemplo, FcγRIIa), linfocitos B (por ejemplo, FcγRIIb), monocitos y células derivadas de monocitos inclusive células dendríticas. La IVIG es una formulación de productos de inmunoglobulina G (IgG) purificada y estéril que se fabrican a partir del plasma humano agrupado que normalmente contiene más del 90 % de IgG sin modificar, con pequeñas y variables cantidades de inmunoglobulinas multiméricas, IgA o IgM (Rutter A *et ál.*, J Am Acad Dermatol, junio de 2001; 44(6): 1010-1024).

Gran parte de los datos publicados sugieren que la fracción IgG agregada y pequeña de hIVIG, específicamente la parte Fc de esos agregados, es desproporcionalmente eficaz en el tratamiento de ciertas enfermedades mediadas por complejos inmunes patológicos. Se ha observado que los

rastrros (1-5 %) de IgG están presentes como formas multiméricas dentro de IVIG y los dímeros de IgG pueden compensar 5-15 % de hIVIG. Se han descrito las alternativas a la terapia de IVIG usando multímeros de Fc producidos recombinantemente que se unen ávidamente a los receptores Fc y C1q de componente de complemento, similar a agregados de IVIG (véase publicación de solicitud de patente n.º 2010/0239633, US 2013/0156765, US 2015/0218236 y publicación PCT n.º WO 2015/132364).

Uno de estos multímeros Fc, GL-2045, se ha descrito previamente (publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2013/0156765). GL-2045 es un stradomer general multimerizante que es un imitador recombinante de IVIG. GL-2045 se une a la mayoría o todos los ligandos a los que se une Fc de inmunoglobulina IgG1. Además, GL-2045 se une con alta afinidad y avidéz a todos los receptores canónicos y a C1q de complemento y tiene 10 - 1,000 veces más eficacia *in vitro* en comparación con IVIG. Además, GL-2045, o su equivalente murino, es eficaz en varios modelos animales de enfermedad autoinmune inclusive artritis inducida por colágeno, neuropatía autoinmune experimental, púrpura trombocitopénica idiopática y miastenia gravis autoinmune experimental. De este modo, GL-2045 también tiene utilidad clínica potencial para tratar un amplio rango de enfermedades autoinmunes inclusive, de modo no taxativo, púrpura trombocitopénica idiopática, polineuropatía inflamatoria crónica, neuropatía motora multifocal, miastenia gravis, trasplante de órganos y artritis reumatoide.

Además de la ventaja de GL-2045 sobre IVIG en cuanto a potencia y eficacia, GL-2045 demuestra varias ventajas en el proceso de fabricación. IVIG es un producto de sangre humana agrupada, lo que significa que deriva de la sangre de decenas de miles de donantes cuyo suero se mezcla y luego se purifica para quitar virus y otros agentes infecciosos, así como IgG agregado. De este modo, el acceso y suministro son limitados y los costos de producción son altos. Además, existe un grado considerable de variabilidad entre lotes de IVIG. Por el contrario, GL-2045 se produce recombinantemente y por lo tanto evita las dificultades de suministro y costos de producción a la vez que proporciona un mayor control del proceso de fabricación.

El homodímero de GL-2045 se une con afinidad y sin avidéz sustancial a ligandos Fc inclusive receptores Fc gamma y C1q de complemento. También forma naturalmente multímeros de orden superior capaces de unirse a receptores canónicos con avidéz. Son estos multímeros de orden superior de GL-2045 que imitan la eficacia potenciada de las fracciones multiméricas de IVIG. Las condiciones de cultivo celular estándar, sin embargo, producen niveles variados de viabilidad celular, grados de proteínas multimerizadas y titulaciones de proteína. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de métodos para fabricar GL-2045 que resulten en un patrón de multímero

definido y particularmente uno que resulte en un mayor porcentaje de multímeros de orden superior a la vez que se optimiza la viabilidad celular y la titulación de proteína.

COMPENDIO DE LA INVENCION

5 La presente invención proporciona las tres de mejor viabilidad celular, mejor titulación de proteína alta y un sorprendente y considerable aumento en el porcentaje de multímeros de orden superior respecto de técnicas de fabricación estándar. Por lo tanto, este método optimizado de fabricación proporciona composiciones de GL-2045 fabricado de forma óptima con mejor eficacia para tratar enfermedades inflamatorias en comparación con composiciones de GL-2045 no fabricado de
10 forma óptima. La fabricación optimizada de GL-2045 incluye métodos de fabricación corriente arriba optimizados y, en algunas modalidades, métodos corriente abajo optimizados. Los métodos de fabricación corriente arriba optimizados a) generan altas titulaciones de proteína, b) mantienen alta viabilidad celular para minimizar los residuos celulares y c) retienen tanto los multímeros de alto orden del homodímero que son esenciales para el funcionamiento de GL-2045 y, si se desea,
15 del homodímero. Los métodos de fabricación corriente abajo optimizados incluyen varias técnicas de purificación que se emplean específicamente para mantener un perfil de multímero seleccionado de GL-2045. Por lo tanto, en algunas modalidades, en la presente se proporcionan composiciones de GL-2045 con un perfil de multímero definido.

En algunas modalidades, se proporciona un método para producir GL-2045 que comprende
20 cultivar células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés) que se transfectaron establemente con un vector de expresión que codifica GL-2045 a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que las células CHO alcanzan una densidad celular de alrededor de 5 a alrededor de 30 millones de células/mL; cambiar la temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $32.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y cosechar GL-2045 a partir del medio de cultivo. En algunas modalidades, las células se cultivan a una densidad de alrededor
25 de 10 a alrededor de 25 millones de células/mL antes de cambiar la temperatura de crecimiento. En algunas modalidades, las células se cultivan a una densidad de alrededor de 10 a alrededor de 15 millones de células/mL antes de cambiar la temperatura de crecimiento. En algunas modalidades, las células se cultivan a una densidad de alrededor de 15 a alrededor de 20 millones de células/mL antes de cambiar la temperatura de crecimiento. En algunas modalidades, un
30 cambio de temperatura doble se usa con un cambio de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $34\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ alrededor del día 3 con un segundo cambio de temperatura de $34\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $31\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ alrededor del día 7 del cultivo de biorreactor.

En algunas modalidades, las células CHO se cultivan en un medio de cultivo base ActiCHO P. En algunas modalidades, a las células CHO se les suministra durante el cultivo ActiCHO Feed A y ActiCHO Feed B. En algunas modalidades, las células CHO reciben suministro día por medio. En algunas modalidades, el vector de expresión que codifica GL-2045 comprende el péptido líder de SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, el vector de expresión que codifica GL-2045 comprende además una secuencia de reconocimiento de transposasa piggyBac y es transfectado con un vector que codifica una transposasa piggyBac. En algunas modalidades, el vector de expresión que codifica GL-2045 resulta en menos de 20 inserciones genómicas.

En algunas modalidades, se proporciona un GL-2045 producido recombinantemente elaborado por los métodos descritos en la presente. En algunas modalidades, se proporciona un vector de expresión que codifica GL-2045 que comprende un casete de expresión de GL-2045, donde el casete de expresión de GL-2045 está flanqueado por elementos de repetición invertida mínima piggyBac.

En algunas modalidades, se proporciona un método para producir GL-2045 que comprende transfectar células CHO con un vector de expresión descrito en la presente, cultivar células CHO en un biorreactor con medio ActiCHO P a una temperatura de crecimiento de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$, suministrarle a los cultivos de células CHO Acti CHO Feed A y Acti CHO Feed B diariamente a una temperatura de crecimiento de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta que los cultivos alcanzan una densidad celular de alrededor de 10 millones a alrededor de 15 millones de células/mL, cambiar la temperatura de crecimiento de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ a $32.5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y cosechar GL-2045 del medio de cultivo, donde los métodos resultan en una viabilidad celular $>80\%$ el Día 21 y una titulación de proteína final de $>9,000\text{ mg/mL}$ de los cuales $>70\%$ de GL-2045 está presente como multímero, donde $>30\%$ de los multímeros son multímeros de orden superior de GL-2045. En algunas modalidades, la viabilidad celular excede 95% el día 18 de cultivo. En algunas modalidades, el porcentaje de multímeros excede el 80% .

En algunas modalidades, se proporciona un método para purificar GL-2045 producido por los métodos descritos en la presente que comprende purificar GL-2045 a partir del sobrenadante de cultivo por cromatografía de afinidad y pulir GL-2045 por una o más de cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de interacción hidrofóbica.

En algunas modalidades, la filtración de profundidad se emplea antes de la cromatografía de afinidad. En algunas modalidades, el filtro de profundidad es X0HC (Millipore). En algunas modalidades, la unidad de filtración de profundidad retira un alto porcentaje de ADN del

sobrenadante. En algunas modalidades, la unidad de filtración de profundidad es un purificador híbrido Emphaze™ AEX (3M).

En algunas modalidades, la cromatografía de afinidad usa una columna de proteína A. En algunas modalidades, la columna de proteína A comprende una resina resistente a NaOH. En algunas modalidades, la resina de proteína A es una resina MabSelect SuRe. En algunas modalidades, la purificación por cromatografía de afinidad comprende utilizar uno de tres amortiguadores de lavado diferentes para optimizar las condiciones de purificación. En algunas modalidades, la purificación por cromatografía de afinidad comprende eluir GL-2045 de la columna de cromatografía de afinidad. En algunas modalidades, eluir GL-2045 comprende elución con un gradiente de pH. En algunas modalidades, eluir GL-2045 comprende elución sin un gradiente de pH. En una modalidad, la elución se realiza usando un amortiguador de glicina. En otra modalidad, la elución se realiza usando un amortiguador de ácido acético. En algunas modalidades, la columna de cromatografía de afinidad se regenera para retirar GL-2045 unido. En algunas modalidades, la columna de cromatografía de afinidad se regenera más frecuentemente de lo que sugiere el fabricante. En algunas modalidades, la columna de cromatografía de afinidad se regenera antes de cada ciclo de purificación. En algunas modalidades, la columna de cromatografía de afinidad se regenera con un amortiguador de NaOH 0.5 M.

En algunas modalidades, pulir GL-2045 comprende cromatografía de intercambio aniónico de paso de flujo. En algunas modalidades, la cromatografía de intercambio aniónico de paso de flujo comprende usar una columna Q Sepharose Fast Flow. En algunas modalidades, pulir GL-2045 comprende cromatografía de intercambio catiónico. En algunas modalidades, la cromatografía de intercambio catiónico comprende usar una columna POROS XS. En algunas modalidades, la cromatografía de intercambio catiónico comprende usar un amortiguador de elución de acetato de sodio. En algunas modalidades, el amortiguador de elución comprende además 36.5-39.0 % de un amortiguador de NaCl 1 M. En una modalidad, el método de elución es elución por etapas y en otra modalidad, la elución es elución de gradiente. En algunas modalidades, pulir GL-2045 comprende cromatografía de interacción hidrofóbica. En algunas modalidades, la cromatografía de interacción hidrofóbica comprende usar una resina de Butilo FF. En algunas modalidades, la cromatografía de interacción hidrofóbica comprende usar una resina de Fenilo HP. En algunas modalidades, la cromatografía de interacción hidrofóbica ("HIC", por sus siglas en inglés) comprende usar una resina de fenilo sefarosa 6 de flujo rápido, sust. alta. En una modalidad, el método de HIC es en modo de paso de flujo y en otra modalidad el método de HIC es en modo de unión. En algunas modalidades, la resina de HIC resulta en el aislamiento del homodímero de GL-

2045. En algunas modalidades, la cromatografía de interacción hidrofóbica comprende usar una resina de Octilo FF. En algunas modalidades, la columna resulta en la eliminación de agregados sin orden de GL-2045.

En algunas modalidades, se proporciona un método para purificar GL-2045 que comprende purificar GL-2045 a partir del sobrenadante de cultivo por cromatografía de afinidad de proteína A, donde la columna de proteína A usa medio resistente alcalino como el medio MabSelect SuRe, donde la purificación se realiza con al menos dos ciclos de lavado y donde se realizan procedimientos de limpieza en sitio (CIP, por sus siglas en inglés) después de cada procesamiento de purificación con un paso de regeneración de NaOH alto como amortiguador de NaOH 0.5 M.

En algunas modalidades, se proporciona un método para purificar GL-2045 que comprende pulir GL-2045 por cromatografía de intercambio catiónico, donde la columna de intercambio catiónico contiene una resina de alta capacidad y alta resolución como POROS XS y donde el amortiguador de elución es un amortiguador de acetato de sodio de 36.5-39.0 % de un amortiguador de NaCl 1 M. En algunas modalidades, el método para purificar GL-2045 comprende además pulir GL-2045 por cromatografía de intercambio aniónico, donde la columna de intercambio aniónico contiene un medio de intercambio aniónico fuerte con alta estabilidad química, protocolos de limpieza en sitio y sanitación permitidos, como el medio Q Sepharose Fast Flow. En algunas modalidades, el método para purificar GL-2045 comprende además pulir GL-2045 por cromatografía de interacción hidrofóbica, donde el medio de interacción hidrofóbica es una resina de Butilo FF, Fenilo HP u Octilo FF y se selecciona para aislar o retirar una fracción particular de GL-2045 además de pulir. En algunas modalidades, el método para purificar y/o pulir GL-2045 resulta en una titulación de proteína final de GL-2045 > 4 g/L después de todos los pasos de filtración y cromatografía (es decir, la sustancia de fármaco final). En algunas modalidades, la composición de proteína final de GL-2045 comprende >70 % de multímeros. En algunas modalidades, >28 % de multímeros son multímeros de orden superior como se analiza por SEC-HPLC analítica.

En algunas modalidades, se proporciona un GL-2045 purificado elaborado por los métodos descritos en la presente. En algunas modalidades, el GL-2045 purificado hecho por los métodos descritos en la presente tiene un patrón de multímero definido que minimiza el porcentaje de homodímeros y/o dímeros de los homodímeros, o de otro modo equilibra el porcentaje de homodímeros, multímeros de orden inferior, multímeros de orden superior y multímeros de orden máximo. En algunas modalidades, se proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno inflamatorio, autoinmune o infeccioso en un sujeto que lo necesita con el GL-2045 purificado y producido recombinantemente descrito en la presente. En algunas

modalidades, la enfermedad o trastorno se selecciona de púrpura trombocitopénico idiopático, polineuropatía inflamatoria crónica, neuropatía motora multifocal, miastenia gravis, trasplante de órganos y artritis reumatoide. En algunas modalidades, el GL-2045 se administra en forma intravenosa, subcutánea, oral, intraperitoneal, sublingual, bucal, transdérmica, por implante subdérmico o intramuscular.

En algunas modalidades, se proporciona una composición de GL-2045 producido recombinantemente, donde la fracción de homodímero de la composición de GL-2045 comprende menos que alrededor de 20 % de la composición total. En algunas modalidades, la fracción de homodímero comprende 12-19 % de la composición total. En otras modalidades, la fracción de homodímero comprende 14-19 % de la composición total. En algunas modalidades, la fracción de homodímero comprende 15.5-17.5 % de la composición total. En otra modalidades, la fracción de homodímero comprende alrededor de 16.2 % de la composición total.

En algunas modalidades, se proporciona una composición de GL-2045 producido recombinantemente, donde el dímero de la fracción de homodímero de la composición de GL-2045 comprende alrededor de 7% a alrededor de 12 % de la composición total. En algunas modalidades, el dímero de la fracción de homodímero comprende alrededor de 9 % a alrededor de 11 % de la composición total. En otras modalidades, el dímero de la fracción de homodímero comprende alrededor de 10 % de la composición total.

En algunas modalidades, se proporciona una composición de GL-2045 producido recombinantemente, donde el trímero de la fracción de homodímero de la composición de GL-2045 comprende alrededor de 5.5 % a alrededor de 11 % de la composición total. En algunas modalidades, el trímero de la fracción de homodímero comprende alrededor de 6.5 % a alrededor de 8 % de la composición total. En otras modalidades, el trímero de la fracción de homodímero comprende alrededor de 7 % de la composición total.

En algunas modalidades, se proporciona una composición de GL-2045 producido recombinantemente, donde el tetrámero de la fracción de homodímero de la composición de GL-2045 comprende alrededor de 10 % a alrededor de 16 % de la composición total. En algunas modalidades, el tetrámero de la fracción de homodímero comprende alrededor de 13 % a alrededor de 15 % de la composición total. En otras modalidades, el tetrámero de la fracción de homodímero comprende alrededor de 14 % de la composición total.

En algunas modalidades, se proporciona una composición de GL-2045 producido recombinantemente, donde el pentámero de la fracción de homodímero de la composición de GL-2045 comprende alrededor de 6 % a alrededor de 9 % de la composición total. En algunas

modalidades, el pentámero de la fracción de homodímero comprende alrededor de 7 % a alrededor de 8 % de la composición total. En otras modalidades, el pentámero de la fracción de homodímero comprende alrededor de 7 % de la composición total.

En algunas modalidades, se proporciona una composición de GL-2045 producido recombinantemente, donde el hexámero de la fracción de homodímero de la composición de GL-2045 comprende alrededor de 10 % a alrededor de 14 % de la composición total. En algunas modalidades, el hexámero de la fracción de homodímero comprende alrededor de 12 % a alrededor de 13 % de la composición total. En otra modalidades, el hexámero de la fracción de homodímero comprende alrededor de 12.7 % de la composición total.

En algunas modalidades, se proporciona una composición de GL-2045 producido recombinantemente donde los multímeros de orden máximo (es decir, los que están en el 7^{er} del homodímero y fracciones superiores) comprenden al menos alrededor de 28 % de la composición total. En algunas modalidades, los multímeros de orden máximo no comprenden más que 35 % de la composición total. En algunas modalidades, las fracciones de multímero de orden máximo comprenden de alrededor de 30 % a alrededor de 34 % de la composición total. En otras modalidades, las fracciones de multímero de orden máximo comprenden alrededor de 31.4 % de la composición total.

En algunas modalidades, se proporciona una composición de GL-2045 producido recombinantemente donde

- (a) la fracción homodimérica comprende menos que alrededor de 20 % de la composición total;
- (b) las fracciones de multímero de orden máximo comprenden al menos alrededor de 28 % de la composición total;
- (c) el dímero de la fracción de homodímero comprende de alrededor de 7 % a alrededor de 12.5 % de la composición total;
- (d) el trímero de la fracción de homodímero comprende de alrededor de 5.5 % a alrededor de 11 % de la composición total;
- (e) el tetrámero de la fracción de homodímero comprende de alrededor de 10 % a alrededor de 16 % de la composición total;
- (f) el pentámero de la fracción de homodímero comprende de alrededor de 6 % a alrededor de 10 % de la composición total;
- (g) el hexámero de la fracción de homodímero comprende de alrededor de 10 % a alrededor de 14 % de la fracción total;

(h) el dímero del homodímero al hexámero de la fracción de homodímero comprende de alrededor de 40 % a alrededor de 60 % de la composición total;

(i) el trímero del homodímero al hexámero de las fracciones de homodímero comprende de alrededor de 32 % a alrededor de 50 % de la composición total;

5 (j) el tetrámero del homodímero al hexámero de la fracción de homodímero comprende de alrededor de 26 % a alrededor de 39 % de la composición total;

(k) el pentámero del homodímero al hexámero de la fracción de homodímero comprende de alrededor de 18 % a alrededor de 23 % de la composición total; o

(l) cualquier combinación de (a)-(k).

10 En algunas modalidades, se proporciona una composición de GL-2045 producido recombinantemente, donde aproximadamente 80 % de la composición total comprende multímeros de orden superior, lo que significa el dímero del homodímero y más (es decir, banda 2 y más). En algunas modalidades, aproximadamente 60-80 % de la composición de GL-2045 producido recombinantemente total comprende el trímero del homodímero y más (es decir, banda 3 y más).

15 En algunas modalidades, alrededor de 54-72 % de la composición de GL-2045 producido recombinantemente total comprende el tetrámero y más (es decir, banda 4 y más). En algunas modalidades, se proporciona un GL-2045 donde aproximadamente 44 -57 % de la composición total comprende el pentámero y más (es decir, banda 5 y más). En algunas modalidades, aproximadamente 38-51 % del total de la composición de GL-2045 producido recombinantemente

20 comprende el hexámero y más (es decir, banda 6 y más).

En algunas modalidades, se proporciona un GL-2045 producido recombinantemente donde las bandas 2-6 de la composición (es decir, el dímero del homodímero al hexámero del homodímero) comprenden alrededor de 39-61 % de la composición. En algunas modalidades, se proporciona un

GL-2045 producido recombinantemente donde las bandas 3-6 de la composición (es decir, el

25 trímero del homodímero al hexámero del homodímero) comprenden alrededor de 32-50 % de la composición. En algunas modalidades, se proporciona un GL-2045 producido recombinantemente donde las bandas 4-6 de la composición (es decir, el tetrámero del homodímero al hexámero del homodímero) comprenden alrededor de 26-39 % de la composición. En algunas modalidades, se proporciona un GL-2045 producido recombinantemente donde las bandas 5-6 de la composición

30 (es decir, el pentámero del homodímero al hexámero del homodímero) comprenden alrededor de 16-23 % de la composición.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las Figura 1A - Figura 1B ilustran el fraccionamiento de GL-2045 por cromatografía de exclusión por tamaño (Figura 1A) y análisis de las fracciones resultantes por geles no reductores (Figura 1B).

La Figura 2 ilustra un análisis de interferometría de biocapa de las fracciones de GL-2045.

5 Las Figura 3A - Figura 3B ilustran resultados de análisis de gel (Figura 3A) y fraccionamiento de exclusión por tamaño (Figura 3B) para GL-2045.

Las Figura 4A - Figura 4D ilustran los efectos de las fracciones de GL-2045 en un ensayo de destrucción celular dependiente del complemento.

10 Las Figura 5A - Figura 5C ilustran un cromatograma de elución (Figura 5A) y análisis SDS-Page de GL-2045 para usarse en un ensayo de unión a Fc γ R1IIa (Figura 5B y 5C).

Las Figura 6A - Figura 6B ilustra la unión de fracciones eluidas mostradas en la Figura 5 a Fc γ R1IIa (Figura 6A) y la curva de mejor ajuste (Figura 6B).

15 La Figura 7 ilustra un análisis SDS-Page de fracciones de intercambio aniónico: GL-GLM-01= recombinante, Fc no fraccionado (G001), GL-GLM-02 = GL-2045 no fraccionado, GL-GLM-05 = GL-2045 fraccionado a pH 6.0, GL-GLM-06 = GL-2045 fraccionado a pH 6.5, GL-GLM-07 = GL-2045 fraccionado a pH 7.0, GL-GLM-08 = GL-2045 fraccionado a pH 7.5.

20 La Figura 8 ilustra los resultados de un ensayo de quimiotaxis de neutrófilos con C5a como quimioatrayente en presencia de GL-2045 fraccionado o no fraccionado: GL-GLM-01= recombinante, Fc no fraccionado (G001), GL-GLM-02 = GL-2045 no fraccionado, GL-GLM-05 = GL-2045 fraccionado a pH 6.0, GL-GLM-06 = GL-2045 fraccionado a pH 6.5, GL-GLM-07 = GL-2045 fraccionado a pH 7.0, GL-GLM-08 = GL-2045 fraccionado a pH 7.5.

La Figura 9 ilustra la densidad celular (en millones/mL) de células CHO cultivadas en un panel de diferentes medios los días 4, 8 y 10 de cultivo.

25 La Figura 10 ilustra la viabilidad celular (%) de células CHO cultivadas en un panel de diferentes medios los días 4, 8 y 10 de cultivo.

La Figura 11 ilustra la titulación de proteína (mg/mL) de células CHO cultivadas en un panel de diferentes medios el día 10 de cultivo.

Las Figura 12A - Figura 12B ilustran análisis de gel de proteína GL-2045 producidos a partir de células CHO cultivadas en el panel de medios ilustrado en las Figuras 9-11.

30 Las Figura 13A - Figura 13B ilustran cronogramas de suministro de medios PowerCHO3 CD, ADCF-Mab Hyclone y ActiCHO P (Figura 13A) y cronogramas de suministro de medios Cellvento, BalanCD CHO Growth A, CD FortiCHO Life y CD4MCHO Hyclone (Figura 13B).

La Figura 14 ilustra la densidad celular (10^6 células/mL) de células CHO cultivadas en un panel de diferentes medios + combinaciones de suministro los días 0-11 de cultivo.

La Figura 15 ilustra la viabilidad celular (%) de células CHO cultivadas en un panel de diferentes medios + combinaciones de suministro los días 0-11 de cultivo.

- 5 La Figura 16 ilustra la titulación de proteína (mg/mL) de GL-2045 de células CHO cultivadas en un panel de diferentes medios + combinaciones de suministro los días 0-11 de cultivo.

La Figura 17 ilustra un análisis SDS-PAGE de los efectos de las combinaciones de medios + suministro y cronogramas ilustrados en las Figuras 13A-13B en la multimerización de GL-2045.

- 10 Las Figura 18A - Figura 18D ilustran los efectos de medio ActiCHO-P + suministro todos los días (rojo) y medio ActiCHO-P + suministro día por medio (azul) en la densidad celular (Figura 18A), viabilidad celular (Figura 18B), pH de cultivo (Figura 18C) y titulación de proteína GL-2045 (Figura 18D).

La Figura 19 ilustra el efecto de medio ActiCHO-P + suministro todos los días (rojo) y medio ActiCHO-P + suministro cada 3 días (azul) en las titulaciones de proteína GL-2045.

- 15 Las Figura 20A - Figura 20B ilustran los efectos de combinar ActiCHO Feed A con medio base PowerCHO2 (rojo) en la viabilidad celular (Figura 20A) y titulación de proteína GL-2045 (Figura 20B) en comparación con el uso de ActiCHO Feed A con medio base ActiCHO-P (azul).

- 20 Las Figura 21A - Figura 21C ilustran los efectos de condiciones de matraz de agitación optimizadas en la densidad celular (Figura 21A), viabilidad celular (Figura 21B) y titulación de proteína GL-2045 (Figura 21C).

La Figura 22 ilustra un análisis SDS-PAGE de GL-2045 purificado con proteína A.

Las Figura 23A - Figura 23B ilustran un perfil de elución de la columna de proteína A luego de la elución de GL-2045 por elución de gradiente de pH (Figura 23A) y análisis SDS-PAGE de fracciones aisladas (Figura 23B).

- 25 La Figura 24 ilustra un cromatograma de elución y análisis SDS-PAGE no reductor.

La Figura 25 ilustra un cromatograma de elución y análisis SDS-PAGE no reductor.

La Figura 26 ilustra un cromatograma de elución del Procesamiento C1-C3.

La Figura 27 ilustra un análisis SDS-PAGE no reductor de picos de elución 38 % - 39 % del procesamiento C1-C3.

- 30 La Figura 28 ilustra un análisis de densitometría de GL-2045 purificado con cromatografía iónica.

Las Figura 29A - Figura 29B ilustran perfiles de elución de columnas HIC (paneles superiores) y análisis SDS-PAGE de elución y fracciones de paso de flujo (FT) (paneles inferiores).

La Figura 30 ilustra un perfil de elución del pulido de columna HIC de M045 (panel derecho) y análisis Nu-PAGE (panel derecho).

La Figura 31 ilustra un perfil de elución del pulido de columna HIC de M045.

La Figura 32 ilustra un perfil de elución del pulido de columna HIC de M045 y análisis SDS-PAGE.

- 5 La Figura 33 ilustra un patrón de multímero definido de una composición de GL-2045 fabricado de forma óptima.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 10 En enfoque a la producción de GL-2045 recombinante optimizado descrito en la presente incluye métodos de fabricación corriente arriba optimizados que resultan en una multimerización de GL-2045 potenciada a la vez que optimizan la viabilidad celular y titulación de proteína. En algunas modalidades, el estado optimizado se lleva hasta la sustancia de fármaco por fabricación corriente abajo optimizada. Además, en la presente se proporcionan composiciones que comprenden GL-2045 con un patrón de multímero definido. Las composiciones proporcionadas en la presente tienen utilidad para tratar una enfermedad autoinmune, enfermedad inflamatoria, alergia, enfermedad mediada por anticuerpo y enfermedad mediada por complemento.

Como se usa en la presente, «sustancia de fármaco» se refiere a la forma de dosificación final de GL-2045 como la vende el fabricante.

- 20 Como se usa en la presente, el uso de los términos «un» o «una», cuando se utilizan junto con el término «que comprende» en las reivindicaciones y/o memoria descriptiva, pueden referirse a «uno» pero también concuerdan con la definición de «uno o más», «al menos uno» y «uno o más de uno».

- 25 Como se usa en la presente, los términos «biomimético», «molécula biomimética», «compuesto biomimético» y términos relacionados, se refieren a un compuesto realizado por el hombre que imita la función de otro compuesto, como la inmunoglobulina intravenosa humana agrupada («hIVIG»), un anticuerpo monoclonal o el fragmento Fc de un anticuerpo. Los biomiméticos «biológicamente activos» son compuestos que poseen actividades biológicas que son iguales o similares a las de sus contrapartes de origen natural. «De origen natural» significa una molécula, o una parte de esta, que se encuentra, normalmente, en un organismo. De origen natural también significa sustancialmente de origen natural. Los biomiméticos «inmunológicamente activos» son biomiméticos que presentan actividad inmunológica igual o similar a las moléculas inmunológicamente activas de origen natural, como los anticuerpos, citocinas, interleucinas y otras

moléculas inmunológicas conocidas en la técnica. En modalidades preferidas, los biomiméticos de la presente invención son stradomers multimerizados optimizados, como se definen en la presente (por ejemplo, GL-2045 fabricado de forma óptima).

«Unido directamente» significa dos secuencias conectadas entre sí sin secuencias intermedias o externas, por ejemplo, secuencias de aminoácidos derivadas de la inserción de sitios de reconocimiento de la enzima de restricción en el ADN o fragmentos de clonación. Un experto en la técnica entenderá que «unido directamente» abarca la adición o eliminación de aminoácidos siempre y cuando la capacidad de multimerización no se vea considerablemente afectada.

«Homólogo» significa con identidad en la totalidad de la secuencia de una secuencia de ácidos nucleicos o de aminoácidos determinada. Por ejemplo, «80 % homólogo» significa que determinada secuencia comparte aproximadamente el 80 % de identidad con la secuencia reivindicada y que puede incluir inserciones, eliminaciones, sustituciones y cambios de marco. El experto en la técnica comprenderá que las alineaciones de secuencias se pueden realizar para considerar inserciones y eliminaciones para determinar la identidad en la longitud total de una secuencia.

Se ha descrito que hIVIG se une y satura completamente al receptor de Fc neonatal (FcRn) y que tal inhibición competitiva de FcRn puede jugar un importante papel en la actividad biológica de hIVIG (por ejemplo, F. Jin *et ál.*, Human Immunology, 2005, 66(4)403-410). Dado que las inmunoglobulinas que se unen estrechamente a receptores Fc γ también se unen al menos en cierta medida a FcRn, un experto en la técnica reconocerá que los stradomer que pueden unirse a más de un receptor Fc γ también se unirán al FcRn y pueden saturarlo completamente.

Hay dos polimorfos humanos de IgG1, denominados polimorfos DEL y EEM. El polimorfo DEL tiene una D en la posición 356 y una L en la posición 358; el polimorfo EEM tiene una E en la posición 356 y una M en la posición 358 (numeración de Kabat; SEQ ID NO: 2 y 3, polimorfos EEM y DEL, respectivamente). Los stradomers proporcionados en la presente pueden comprender ya sea el polimorfo de IgG1 DEL o el EEM. Por lo tanto, incluso si una oración para un mutante particular se produce explícitamente en el contexto del polimorfismo DEL, un experto en la técnica entenderá que las mismas mutaciones se pueden realizar al polimorfo EEM para proporcionar los mismos resultados.

US 2010/0239633 revela haber utilizado dominios de Fc de inmunoglobulina unida para crear biomiméticos de Fc de inmunoglobulina multimerizada de forma ordenada de hIVIG (multímeros con orden biológicamente activos conocidos como stradomers), que incluyen secuencias cortas que incluyen sitios de restricción y etiquetas de afinidad entre los componentes individuales del

stradomer, para el tratamiento de afecciones patológicas que incluyen enfermedades autoinmunes y otras afecciones inflamatorias. Véase US 2010/0239633, que se incorpora mediante esta referencia en su totalidad. US 2013/0156765 describe stradomers donde los componentes individuales están directamente unidos, en vez de separados por sitios de restricción o etiquetas de afinidad. US 2013/0156765 también describe específicamente un stradomer multimerizante (GL-2045) que comprende un dominio IgG1Fc con un dominio de multimerización bisagra de IgG2 unido directamente a su extremo C, que exhibe unión al complemento y multimerización aumentada respecto a la construcción unida al extremo N (por ejemplo, GL-2019, descrito en US 2010/0239633). Véase US 2013/0156765, que se incorpora mediante esta referencia en su totalidad. La estructura de GL-2045 es: bisagra de IgG1 – IgG1CH2 IgG1 CH3 – bisagra de IgG2 y GL-2045 se proporcionan como SEQ ID NO: 4 y 5 (polimorfos EEM y DEL, respectivamente).

Monómero de unidad de stradomer

Tal como se utiliza en la presente, el término "monómero de unidad de stradomer" se refiere a una molécula de péptidos contiguos individual que, cuando se asocia con al menos un segundo monómero de unidad de stradomer, forma una «unidad de stradomer» homodimérica que comprende al menos un dominio Fc y, en el caso de GL-2045, un dominio de multimerización de bisagra de IgG2. En modalidades preferidas, las unidades de stradomer GL-2045 comprenden dos monómeros de unidad de stradomer asociados. Sin embargo un stradomer GL-2045 también puede contener tres o más monómeros de unidad de stradomer.

El stradomer fabricado de forma óptima de la presente invención (GL-2045 fabricado de forma óptima) contiene un enlace directo entre el extremo N del monómero Fc de IgG1 y el extremo C de un péptido líder (SEQ ID NO: 1) y el extremo C del Fc de IgG1 y el extremo N del dominio de multimerización bisagra de IgG2 (SEQ ID NO: 6).

A modo de un ejemplo aclaratorio, el experto en la técnica entenderá que las moléculas de stradomer fabricado de forma óptima de la presente invención se pueden construir al preparar una molécula de polinucleótido que codifica un monómero de dominio Fc y una región multimerizante. Tal molécula de polinucleótido se puede insertar en un vector de expresión, que se puede utilizar para transformar una población de bacterias o transfectar una población de células de mamífero. Los monómeros de unidad de stradomer luego se pueden producir al cultivar las bacterias transformadas o células de mamífero transfectadas en condiciones de cultivo apropiadas. Por ejemplo, una línea celular clonal que continúa un grupo de células establemente transfectadas se puede lograr al seleccionar células con genetecina/G418. De manera alternativa, las células se

pueden transfectar de forma transitoria con ADN que codifica el stradomer fabricado de forma óptima de la presente invención (por ejemplo, ADN que codifica el stradomer de acuerdo con SEQ ID NO: 4 o 5) bajo el control del promotor de CMV. Los monómeros de unidad de stradomer expresados pueden entonces formar unidades de stradomer funcionales y stradomers ya sea por autoagregación de los monómeros de stradomer o unidades o asociación de monómeros de stradomer utilizando enlaces de monómero dentro de los stradomer. Luego los stradomer expresados pueden purificarse a partir del medio de cultivo celular por métodos de fabricación corriente abajo descritos en la presente (por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de interacción hidrofóbica). Un experto en la técnica entenderá que el péptido líder incluido en la construcción de ácido nucleico se utiliza solo para facilitar la producción de los péptidos de monómero de unidad de stradomer y se escinde al expresarse la proteína madura. Por lo tanto, la biomimética biológicamente activa de la presente invención no comprende un péptido líder.

15 *Stradomer de agrupación*

En una modalidad, el GL-2045 fabricado de forma óptima de acuerdo con la presente descripción es un stradomer de agrupación. Un «stradomer de agrupación» es un biomimético que tiene una forma radial con una «cabeza» de resto central y dos o más «piernas», donde cada pierna comprende uno o más dominios Fc que son capaces de unir al menos un receptor gamma Fc y/o complemento. Un stradomer de agrupación también es conocido como un «stradomer multimerizante» en virtud de la presencia de un dominio de multimerización que tiene como resultado la multimerización del stradomer. Por lo tanto, stradomers en serie que contienen múltiples dominios Fc en una molécula de monómero de stradomer pueden igualmente clasificarse como un stradomer de agrupación o stradomer multimerizante siempre y cuando la molécula también contenga al menos un dominio de multimerización. Cada stradomer de agrupación comprende más de una proteína homodimérica, cada una llamada una «unidad de stradomer de agrupación». Cada unidad de stradomer de agrupación comprende al menos una región que se multimeriza y una región «pierna» que comprende al menos un dominio Fc funcional. La región multimerizante crea una «cabeza» de stradomer de agrupación luego de ser multimerizado con otra unidad de stradomer de agrupación. La región de pierna puede ser capaz de unir tantas moléculas de complemento como hay dominios Fc en cada región de pierna. Por ejemplo, la región de pierna puede unir tantas moléculas C1q como hay dominios Fc en cada región de pierna. Por lo tanto, un stradomer de agrupación es un compuesto biomimético capaz de unir dos o más

moléculas C1q, previniendo de este modo la lisis mediada por el complemento también denominada citotoxicidad dependiente del complemento (CDC, por sus siglas en inglés).

La región multimerizante contenida en el stradomer fabricado de forma óptima de la presente invención es la región bisagra de IgG2. Tal como se conoce en la técnica, la región bisagra de

5 IgG2 humana puede formar dímeros covalentes (Yoo, E.M. *et ál.* J. Immunol. 170, 3134-3138 (2003); Salfeld Nature Biotech. 25, 1369-1372 (2007)). La formación de dímeros de IgG2 está

mediada potencialmente a través de la estructura de bisagra de IgG2 mediante enlaces C-C (Yoo *et ál* 2003), lo que sugiere que la estructura bisagra sola puede mediar la formación de dímeros. La

10 cantidad de dímeros de IgG2 que se encuentran en el suero humano, sin embargo, es limitada. Se estima que la cantidad de IgG2 que existe como un dímero del homodímero es menor que 10 % de

IgG2 total (Yoo *et ál.* 2003). Además, no existen pruebas cuantitativas de la multimerización de IgG2 más allá del dímero del homodímero. (Yoo *et ál.* 2003). Es decir, no se ha descubierto que la

IgG2 nativa forme multímeros de orden superior en el suero humano. Los stradomer que contienen bisagra de IgG2 (por ejemplo, GL-2045 fabricado de forma óptima) están presentes como

15 multímeros de orden superior y, a diferencia de IgG2 natural en suero humano donde las interacciones de la bisagra de IgG2 son variables y dinámicas, GL-2045 ha demostrado formar

multímeros altamente estables evidenciados en geles SDS-PAGE no reductores, ultracentrífuga analítica y estudios de estabilidad de 3 meses al 100 % de humedad a 37 °C. Además, también es

sorprendente que la cantidad de multímeros en las preparaciones de stradomer que contiene 20 bisagra de IgG2 son significativamente mayores que el aproximadamente 10 % de dímeros y sin

multímeros observados para IgG2 en suero humano. Por ejemplo, el porcentaje de stradomers que son multímeros, que incluyen dímeros, trímeros, tetrámeros y multímeros de orden superior del homodímero, excede 20 % y puede exceder 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o incluso 90 %.

En una modalidad especialmente preferida, el porcentaje de GL-2045 presente como homodímero 25 es entre 10 y 20 % y el porcentaje correspondiente de GL-2045 presente como multímeros de

orden superior del homodímero es mayor que 70 %.

La secuencia de aminoácidos de GL-2045 se describe en SEQ ID NO: 4 y 5.

El término polipéptido o péptido «aislado», según se emplea en la presente, hace referencia a un polipéptido o a un péptido que, o bien no tiene una contraparte de origen natural o que se ha

30 separado o purificado a partir de los componentes que lo acompañan naturalmente, por ejemplo, en tejidos como el páncreas, hígado, bazo, ovarios, testículos, músculos, tejido de las articulaciones, tejido neuronal, tejido gastrointestinal o tejido mamario o tejido tumoral (por

ejemplo, tejido de cáncer de mama) o fluidos corporales como sangre, suero u orina. Típicamente,

el polipéptido o péptido se considera «aislado» cuanto está al menos el 70 % libre, en peso seco, de las proteínas y otras moléculas orgánicas de origen natural con las cuales se asocia naturalmente. Preferentemente, una preparación de un polipéptido (o péptido) de la invención es al menos el 80 %, más preferentemente, al menos el 90 % y, con la máxima preferencia, al menos el 99 %, en peso seco, el polipéptido (péptido) de la invención. Como un polipéptido o péptido que se sintetiza químicamente está inherentemente separado de los componentes que naturalmente lo acompañan, el polipéptido o péptido sintético está «aislado».

Un polipéptido (o péptido) aislado de la invención se puede obtener, por ejemplo, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica el polipéptido o péptido; o mediante síntesis química. Un polipéptido o péptido que se produce en un sistema celular diferente de la fuente de la cual se origina naturalmente está «aislado» porque necesariamente carecerá de los componentes que lo acompañan naturalmente. En una modalidad preferida, el polipéptido aislado de la presente invención contiene solo las secuencias correspondientes al monómero de Fc de IgG1 y el dominio de multimerización bisagra de IgG2 (SEQ ID NO: 6) y ninguna secuencia adicional que pueda ayudar con la clonación o purificación de la proteína (por ejemplo, sitios de reconocimiento de enzima de restricción introducidos o etiquetas de purificación). El grado de aislamiento o pureza se puede medir a través de cualquier método adecuado, por ejemplo, cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida o análisis HPLC.

Métodos de fabricación

GL-2045 forma multímeros con orden del homodímero y es activo en el homodímero y todas las fracciones de multímero. Es importante para la función de GL-2045 que los procesos de fabricación resulten en un perfil de multímero optimizado. Como se usa en la presente, «perfil de multímero optimizado» o «perfil de multimerización optimizado» se refiere a la combinación de homodímeros y multímeros de orden superior de GL-2045 que generan el resultado biológico deseado para GL-2045 como imitador de IVIG (por ejemplo, mejor unión a C1q con activación inicial del sistema de complemento y/o inhibición posterior de la activación del complemento y prevención de CDC, por ejemplo, sin limitarse por la teoría, a nivel de C3/C3b). Un experto en la técnica reconocerá que puede ser ventajoso aislar varias fracciones de multímeros del GL-2045 fabricado de forma óptima como producto separado, ya sea solo o en combinación con otros elementos, inclusive con otros fines terapéuticos. Por ejemplo, como se proporciona en los Ejemplos, las fracciones de multímeros más grandes de GL-2045 son más activas que las fracciones de multímeros más pequeñas en la unión a C1q y la modulación de la función efectora

mediada por el complemento corriente abajo y en la unión a FcγRs con baja afinidad. Por lo tanto, los métodos de la presente invención se refieren no solo a composiciones de GL-2045 que comprenden el perfil de multímero optimizado sino también a composiciones de GL-2045 que comprenden solo multímeros selectos basados en la función efectora deseada. En tales modalidades, el perfil de multímero optimizado de GL-2045 que provoca un resultado biológico deseado puede diferir del perfil de multímero optimizado que provoca otro resultado biológico deseado.

Sin pretender limitarse por la teoría, se cree que el homodímero sirve como receptor y amortiguador de ligando, de manera similar a IgG1 no agregada. Los multímeros de orden superior se unen con mayor avidéz a receptores Fcγ de baja afinidad y a factores de complemento (por ejemplo, C1q, que es hexamérico) y, como se describe en la presente, demuestran una mejor eficacia biológica en comparación con homodímeros o multímeros de orden inferior (por ejemplo, dímeros, trímeros y/o tetrámeros del homodímero GL-2045). Por lo tanto, el grado de multimerización es una consideración de fabricación corriente arriba y corriente abajo fundamental en la producción de GL-2045 clínicamente eficaz. De este modo, no solo es deseable mantener una viabilidad celular óptima, alta titulación de proteína y perfiles de multimerización óptimos de GL-2045 mediante métodos de fabricación corriente arriba optimizados, sino también mantener y/o potenciar los perfiles de multimerización óptimos de GL-2045 mediante métodos de fabricación corriente abajo optimizados.

En algunas modalidades, los métodos de fabricación optimizados descritos en la presente resultan en una composición de proteína GL-2045 en la que al menos 70 % o al menos 80 % de GL-2045 está presente como no homodímeros (por ejemplo, dímeros del homodímero, trímeros del homodímero, etc.). En algunas modalidades, más del 70 % o más del 80 % de GL-2045 está presente como no homodímeros. Por ejemplo, los métodos de fabricación optimizados pueden resultar en una composición de proteína GL-2045 donde 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de GL-2045 está presente como no homodímeros. En algunas modalidades, la composición de proteína comprende al menos 28 % o al menos 30 % de GL-2045 presente como multímeros de orden máximo (es decir, 7-mer del homodímero y más). En algunas modalidades, la composición de proteína comprende no más de 35 % de GL-2045 presente como multímeros de orden máximo. En algunas modalidades, la composición de proteína comprende al menos alrededor de 35 % de GL-2045 presente como tetrámeros, pentámeros, hexámeros y 7-mer (es decir, al menos 35 % de la composición de GL-2045 total comprende las fracciones 4-6,). En algunas modalidades, al menos alrededor de 35 % de GL-2045 está presente como trímeros del homodímero y más (es decir, al

menos 35 % de la composición de GL-2045 total comprende la fracción 3 y más). En algunas modalidades, al menos alrededor de 35 % de GL-2045 está presente como trímeros, tetrámeros, pentámeros o hexámeros del homodímero (es decir, al menos 35 % de la composición de GL-2045 total comprende la fracción 3-6). En algunas modalidades, al menos alrededor de 35 % de GL-2045 está presente como tetrámeros del homodímero y más (es decir, al menos 35 % de la composición de GL-2045 total comprende la fracción 4 y más). En algunas modalidades, al menos alrededor de 35 % de GL-2045 está presente como tetrámeros y pentámeros del homodímero (es decir, al menos 35 % de la composición de GL-2045 total comprende las fracciones 4 y 5). En algunas modalidades, al menos alrededor de 35 % de GL-2045 está presente como pentámeros del homodímero y más (es decir, al menos 35 % de la composición de GL-2045 total comprende la fracción 5 y más). En algunas modalidades, al menos alrededor de 35 % de GL-2045 está presente como pentámeros y hexámeros del homodímero (es decir, al menos 35 % de la composición de GL-2045 total comprende la fracción 5 y 6). En algunas modalidades, al menos alrededor de 35 % de GL-2045 está presente como hexámeros del homodímero y más (es decir, al menos 35 % de la composición de GL-2045 total comprende la fracción 6 y más). En algunas modalidades, al menos alrededor de 35 % de GL-2045 está presente como 7-mer del homodímero y más (es decir, al menos 35 % de la composición de GL-2045 total comprende la fracción 7 y más). Por ejemplo, los métodos de fabricación optimizados descritos en la presente pueden resultar en una composición de proteína GL-2045 donde 40 %, 45 %, 50 %, 55 % o más de GL-2045 está presente como pentámeros del homodímero y más. Los métodos de fabricación actuales para agentes terapéuticos que contienen Fc (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) se han enfocado en aumentar la titulación y rendimiento de proteínas mediante los pasos de filtración corriente abajo. Estos métodos generalmente no consideran los efectos del proceso de fabricación en la multimerización de la proteína que contiene Fc y, en total contraste a los métodos descritos en la presente, buscan minimizar la multimerización y agregación de proteínas. Sorprendentemente, las condiciones de cultivo que resultan en los máximos rendimientos de proteína de GL-2045 no necesariamente resultan en el máximo porcentaje de GL-2045 presente como multímeros. De este modo, los datos descritos en la presente demuestran que las variables de fabricación que afectan la titulación de proteína total son, al menos en parte, independientes de las variables que afectan los perfiles de multimerización. Por lo tanto, un experto en la técnica no podría predecir qué condiciones de fabricación corriente arriba afectarían la multimerización de GL-2045 en función del estado de la técnica actual.

Por ejemplo, los protocolos establecidos de producción de proteínas recombinantes con células de ovario de hámster chino (CHO) prevén un cambio de temperatura de 37° C a 31° C en un día específico de cultivo (Ouguchi *et ál*, Cytotechnology, 52(3), pp. 199-207, (2006); Masterson y Smales, Pharmaceutical Bioprocessing, 2(1), pp. 49-61, (2014)). Sin embargo, los inventores de la presente han descubierto que, contrario a lo que se describió en Ouguchi, *et ál.*, un cambio de temperatura de 37° C a 32.5° C resultaba en un mantenimiento de la densidad celular y alta viabilidad celular a la vez que optimizaba la titulación de proteína. Además, los inventores descubrieron que el cambio de la temperatura en función de la densidad celular, más que en un día dado de cultivo como se describió anteriormente, resultaba en titulaciones de proteína de GL-2045 potenciadas de casi 10 g/L.

Además, los inventores de la presente descubrieron que el mantenimiento de perfiles de multimerización optimizados resultantes de métodos de fabricación corriente arriba optimizados depende en parte de métodos de fabricación corriente abajo optimizados (por ejemplo, cromatografía de afinidad y/o cromatografía de intercambio iónico). Las técnicas de purificación y filtración de proteínas de fusión Fc y anticuerpo monoclonal (mAb) se describen ampliamente y se usan habitualmente. Sin embargo, cuando se aplican a GL-2045, estas técnicas resultan en modificaciones impredecibles del perfil de multimerización de GL-2045. Por ejemplo, los inventores de la presente han descubierto sorprendentemente que la mayoría de las columnas de proteína A no son adecuadas para purificar GL-2045, pese a su uso rutinario en la purificación de mAb y proteínas de fusión Fc, como se demuestra en el Ejemplo 8. La proteína A es un reactivo extremadamente caro, cuesta millones de dólares usarla en cumplimiento con buenas prácticas de fabricación (GMP, por sus siglas en inglés) para la purificación de un solo fármaco y se debe reutilizar tanto como 100 veces o más para que sea rentable económicamente. Al igual que mAb y proteínas de fusión Fc, GL-2045 se une a la proteína A; sin embargo, a diferencia de mAb y proteínas de fusión Fc, GL-2045 no se disocia completamente de la proteína A con etapas de elución normales debido a la ávida unión de GL-2045 a la proteína A. Los inventores de la presente han descubierto inesperadamente que el uso de columnas de proteína A para la purificación de GL-2045, donde el perfil de multimerización óptimo se mantiene, requiere un cronograma de limpieza de columna más frecuente.

Los inventores de la presente invención han descubierto también que los procedimientos de limpieza en el sitio (CIP) de la columna de proteína A utilizados habitualmente en la técnica resultan inesperadamente en un cambio en el perfil de multimerización de GL-2045. Los procedimientos de CIP normales implican la limpieza de la columna al final de un procesamiento

de purificación, que puede implicar varios ciclos de pasaje de sobrenadante de proteína a través de la columna. Sin embargo, los inventores de la presente han descubierto que la alta avidéz de GL-2045 da como resultado una falta de disociación de GL-2045 de la proteína A. En consecuencia, los sitios de unión de la proteína A permanecen ocupados, evitando que GL-2045 se una en ciclos posteriores y resulte en una pérdida del homodímero. Por lo tanto, en contraste con los protocolos utilizados con mAb y proteínas de fusión Fc, los inventores de la presente han descubierto inesperadamente que con GL-2045, la limpieza CIP de las columnas de proteína A debe hacerse más frecuentemente de lo que se hace con un anticuerpo monoclonal o proteína de fusión Fc y con un amortiguador de regeneración altamente riguroso, como NaOH 0.5 M.

Los gradientes de elución de pH se usan habitualmente con columnas de proteína A para optimizar el rendimiento de proteína durante la purificación. Los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que los gradientes de elución de pH usados en la técnica para optimizar los rendimientos de la columna de proteína A de anticuerpos monoclonales o proteínas de fusión Fc pueden provocar una pérdida indeseada de homodímero o componentes de multímero de orden superior de GL-2045, cambiando de este modo el perfil de multimerización de GL-2045 (demostrado en el Ejemplo 10). De este modo, los inventores de la presente invención también han determinado un medio para usar la técnica de gradiente de elución para optimizar la combinación de rendimiento y multimerización de GL-2045. Además, los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que el gradiente de elución de pH puede aplicarse a la columna de proteína A con un propósito novedoso, a saber para separar los multímeros de GL-2045 más grandes y de orden superior de los agregados de homodímero (como se demuestra en el Ejemplo 11).

Los inventores de la presente invención también han descubierto que, al usar columnas de intercambio iónico habitualmente usadas en la técnica para purificar anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión Fc, como intercambio aniónico e intercambio catiónico, los cambios en pH y/o sal pueden cambiar el perfil de multimerización de GL-2045, como se demuestra en el Ejemplo 12. Esto es completamente contrario a un anticuerpo monoclonal o proteína de fusión Fc donde los cambios en la sal o pH pueden resultar en la pérdida de una pequeña cantidad de proteína pero ningún cambio en la composición del fármaco. Además, los inventores de la presente invención han descubierto sorprendentemente que los ajustes de sal y/o pH pueden usarse con un propósito novedoso, para separar los multímeros de GL-2045 más grandes y de orden superior de agregados de homodímero que pueden tener una masa molecular similar. Como se demuestra en el Ejemplo 13, los inventores usan un ensayo funcional para demostrar que la eliminación de

agregados desordenados de las fracciones de multímero de orden máximo está asociada con una mayor potencia y un producto de GL-2045 más altamente purificado.

Las columnas de interacción hidrofóbica (HIC, por sus siglas en inglés), se usan habitualmente en la técnica para purificar anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión Fc mediante una variedad de mecanismos inclusive captura de alto rendimiento, pulido de anticuerpos monoclonales, eliminación de especies truncadas de formas de longitud completa, separación de formas activas de inactivas y limpieza de virus. Sin embargo, cuando se usan en el contexto de GL-2045, los inventores han descubierto que las columnas de HIC estándar son impredecibles. Como se demuestra en el Ejemplo 14, 7 columnas de HIC compuestas por diferentes matrices se asocian con tasas de captura ampliamente diferentes, que varían de 16 % a 62 %, pese a que se usa el mismo sobrenadante y el mismo amortiguador con todas las columnas.

Además, los inventores de la presente invención predicen que los cambios en el amortiguador pueden cambiar el perfil de multimerización de GL-2045. Esto es completamente contrario a un anticuerpo monoclonal o proteína de fusión Fc donde los cambios en el amortiguador resultarían en la pérdida de una pequeña cantidad de proteína o un pulido menos perfecto pero ningún cambio en la composición fundamental del fármaco.

Además, los inventores de la presente invención han descubierto que debido a que el homodímero de GL-2045 está compuesto de Fc de IgG1 y un dominio multimerizante que provoca la formación de multímeros de orden superior, GL-2045 se une con avidez a todos o casi todos los diversos ligandos y objetivos que se unen sin avidez a un homodímero de Fc de IgG1 natural. Esto incluye, de manera no sorprendente, todos los receptores Fc de baja afinidad y C1q de complemento así como proteína A y proteína G utilizados habitualmente en columnas de purificación. Sin embargo, esta ávida unión también resulta en una potencial unión al objetivo menos deseable, por ejemplo, endotoxina. Por esta razón, los inventores de la presente han determinado que se desea un proceso de purificación de múltiples etapas, inclusive la purificación de GL-2045 por proteína A y pulido de GL-2045 purificado por proteína A, por al menos una o más de columnas de cromatografía de intercambio catiónico, paso de flujo de intercambio aniónico e interacción hidrofóbica. En una modalidad preferida, se desea un proceso de purificación de cuatro etapas, inclusive la purificación de GL-2045 por proteína A y el pulido de GL-2045 purificado por proteína A por las tres de columnas de cromatografía de intercambio catiónico en modo de unión, intercambio aniónico en modo de paso de flujo e interacción hidrofóbica en modo de unión o de paso de flujo. Este proceso de purificación de cuatro etapas se describe en el Ejemplo 15. Un experto en la técnica comprenderá fácilmente que se pueden agregar etapas de filtración

adicionales, inclusive etapas de filtración de profundidad y ultrafiltración, en cualquier momento, antes, durante o después de proceso descrito en el Ejemplo 15 para purificar adicionalmente la composición de GL-2045.

5 *Fabricación corriente arriba*

En términos generales, los métodos de fabricación corriente arriba son métodos donde los materiales biológicos están inoculados y crecen en cultivo, en condiciones controladas, para fabricar ciertos tipos de productos biológicos de proteína (por ejemplo, GL-2045). Como se usa en la presente, «métodos de fabricación corriente arriba» se refiere específicamente a métodos para la producción recombinante de una proteína sin referencia a una etapa posterior de purificación y filtración que se categorizan frecuentemente como métodos de fabricación corriente abajo. Los métodos de fabricación corriente arriba con alteraciones o cambios dirigidos a la optimización de una característica de proteína específica (por ejemplo, eficacia de multimerización) se denominan en la presente «métodos de fabricación corriente arriba optimizados». Varios aspectos de la fabricación de proteínas corriente arriba pueden optimizarse (por ejemplo, cambiarse o alterarse para lograr un resultado deseado) para resultar en un producto de proteína final con características específicas. Los aspectos de la producción de proteínas recombinantes corriente arriba que pueden optimizarse incluyen, de modo no taxativo, la composición del vector de expresión que codifica la proteína, tipo celular, medio basal, aditivos de medios inclusive suministros, cronograma de suministro, cronograma de pasaje, temperatura de cultivo, cambio de temperatura, humedad, grado de aireación, pH, densidad de célula de sembrado, nivel de CO₂ y/o nivel de oxígeno. En algunas modalidades, los métodos de fabricación corriente arriba optimizados descritos en la presente resultan en la producción de una alta titulación de GL-2045 con un aumento en el porcentaje de multímeros de orden superior en comparación con GL-2045 producido por métodos de fabricación corriente arriba no optimizados.

En algunos aspectos de la invención, las células de ovario de hámster chino (CHO) se transfectan con un vector de expresión que codifica GL-2045. En algunos aspectos, la inserción del casete de expresión de GL-2045 en el genoma está mediada por el transposón piggyBac, donde el casete de expresión de GL-2045 está flanqueado por elementos de repetición invertida mínimos de piggyBac. La coexpresión de este vector de expresión de GL-2045 con un vector que codifica una transposasa piggyBac media la integración génica en regiones del genoma que se transcriben de manera activa, lo que resulta en la generación de líneas celulares con expresión génica estable y potenciada en comparación con métodos de transfección estándar (véase, US 2010/0311116 y

Matasci *et ál*, Biotechnol. Bioeng. V. 108, pp 2141-2140, (2011), que se incorpora en la presente a modo de referencia). El sistema de piggyback habitualmente aumenta la producción de proteínas debido, al menos en parte, a un alto número de transgenes integrados. Sin embargo, los inventores de la presente invención seleccionaron una línea celular de alta titulación y alta viabilidad clonal donde la velocidad de inserción del transgén era relativamente baja (por ejemplo, aproximadamente 11 copias determinado por espectrofotometría UV); sin embargo, un experto en la técnica entenderá que el uso de presión antibiótica selectiva permite también el uso de las velocidades de inserción del transgén de más de alrededor de 50 copias insertadas o más de alrededor de 100 copias insertadas. En algunos aspectos, el vector de expresión comprende un ácido nucleico que codifica un péptido líder (por ejemplo, SEQ ID NO: 1). En algunos aspectos, el vector de expresión comprende además un gen de resistencia a antibióticos para permitir la selección de células CHO transfectadas de manera exitosa. En algunos aspectos de la invención, las células CHO transfectadas de manera exitosa se generan en ausencia de selección de antibióticos (véase, US 2010/0311116). En algunos aspectos, el vector de expresión comprende además un promotor transcripcional para promover una expresión de alto nivel de GL-2045 (por ejemplo, un promotor de CMV).

En algunas modalidades, las células CHO transfectadas con un vector de expresión de GL-2045 se cultivan en un biorreactor. En algunas modalidades, la línea de células CHO, de las cuales hay muchas variantes, se selecciona cuidadosamente de modo que sea transfectada establemente con un vector de expresión de GL-2045 usando técnicas que provocan la inserción preferentemente en sitios activos desde el punto de vista de la transcripción. En algunas modalidades, las condiciones de cultivo aplicadas a dicha línea de célula CHO transfectada permite que el protocolo de cultivo continúe más tiempo que por métodos de fabricación estándar sin afectar la viabilidad celular de manera adversa. Los métodos de fabricación estándar pueden promediar 12 días en un biorreactor, en cuyo momento hay una reducción en la viabilidad celular debido a un aumento en el residuo celular presente en el cultivo. Además de estar asociado con una pérdida de la viabilidad celular, el residuo celular aumenta drásticamente los desafíos asociados con la filtración y purificación. En algunas modalidades de la presente invención, las células se siembran en un biorreactor a una densidad celular predeterminada y se cultivan durante > 12 días. En algunas modalidades, las células se cultivan en el biorreactor con una densidad celular viable aceptable durante 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o más días.

En algunas modalidades, se usa ActiCHO P como medio basal para la fabricación corriente arriba optimizada de GL-2045 fabricado de forma óptima. Los términos «ActiCHO P» y «medio

optimizado», como se usan de manera intercambiable en la presente, se refieren a medio base ActiCHO® comercialmente disponible («ActiCHO P», GE Healthcare), cualquier copia sustancial de este, o medio que comprende sustancialmente los mismos constituyentes en sustancialmente las mismas cantidades que ActiCHO P. ActiCHO P también se ha comercializado recientemente por GE como Hyclone «ActiPro», un producto casi idéntico a ActiCHO P y que es un reactivo equivalente a los efectos de la presente descripción. En algunas modalidades, ActiCHO® Feed A y Feed B (también comercializados recientemente por GE como Hyclone “Cell Boost 7a” e Hyclone “Cell Boost 7b,” que son productos idénticos a ActiCHO® Feed A y Feed B y son reactivos equivalentes a los efectos de la presente descripción) se usan además del medio basal. Los términos «ActiCHO Feed A» o «feed A optimizado», como se usan de manera intercambiable en la presente y «ActiCHO Feed B» o «feed B optimizado», como se usan de manera intercambiable en la presente se refieren a ActiCHO® Feeds (GE Healthcare) comercialmente disponibles, copias sustanciales de estos o suministros que comprenden sustancialmente los mismos constituyentes en sustancialmente las mismas cantidades que ActiCHO Feed A y/o ActiCHO Feed B. En algunos aspectos de la invención, a las células CHO transfectadas con un vector de expresión GL-2045 se les suministra ActiCHO Feed A y Feed B cada día. En algunos aspectos de la invención, a las células CHO transfectadas con un vector de expresión de GL-2045 se les suministra ActiCHO Feed A y Feed B día por medio. En algunos aspectos de la invención, a las células CHO transfectadas con un vector de expresión de GL-2045 se les suministra ActiCHO Feed A y Feed B mediante suministro continuo.

En algunas modalidades de métodos de fabricación corriente arriba optimizados, las células CHO transfectadas con un vector de expresión de GL-2045 se cultivan a una densidad celular específica antes de cambiar la temperatura. En algunos aspectos, las células CHO se cultivan a una densidad de alrededor de 5 – 30 millones de células/mL antes de cambiar la temperatura. En algunos aspectos, las células se cultivan a una densidad de alrededor de 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 o alrededor de 30 millones de células/mL antes de cambiar la temperatura. En algunos aspectos, las células CHO se cultivan a una densidad de alrededor de 10 – 25 millones de células/mL antes de cambiar la temperatura. En algunos aspectos de métodos de fabricación optimizados, las células CHO se cultivan a una densidad de alrededor de 10 – 15 millones de células/mL antes de cambiar la temperatura.

En algunas modalidades, las células CHO transfectadas con un vector de expresión de GL-2045 se cultivan a 37° C ± 1°C hasta alcanzar una densidad celular predeterminada. En algunos aspectos, la temperatura se cambia a 32.5° C ± 1 °C después de que las células alcanzan una

densidad celular predeterminada. Este aspecto es en contraste a los métodos de cultivo descritos anteriormente para la producción de proteínas recombinantes, donde las células se cultivan a 37 °C por una cantidad predeterminada de días, luego de lo cual la temperatura se cambia frecuentemente a 31 °C (Ouguchi *et ál*, Cytotechnology, 52(3), pp. 199-207, (2006); Masterson y Smales, Pharmaceutical Bioprocessing, 2(1), pp. 49-61, (2014)). Los inventores de la presente han determinado que cambiar la temperatura de 37 °C $\pm$ 1 °C a 32.5 °C $\pm$ 1 °C en función de la densidad celular, en vez del tiempo del cultivo, proporciona inesperadamente la combinación de mayor viabilidad, mayor densidad celular y aumento considerable de la titulación de proteína respecto de métodos de fabricación corriente arriba estándar. En algunas modalidades, las células CHO transfectadas con un vector de expresión de GL-2045 se someten a un doble cambio de temperatura. En una modalidad, las células CHO transfectadas se cultivan a 37 °C $\pm$ 1 °C y se cambian a 34 °C $\pm$ 1 °C antes de alcanzar la densidad celular viable pico. En una modalidad preferida, este cambio de temperatura ocurre mientras las células CHO permanecen en una fase de crecimiento logarítmico. En una modalidad especialmente preferida, el cambio de temperatura inicial se produce el día 3 o 4 de cultivo. En otra modalidad, las células CHO transfectadas se cultivan a 37 °C $\pm$ 1 °C hasta alcanzar una densidad celular predeterminada, momento en el cual la temperatura cambia a 34 °C $\pm$ 1 °C. En una modalidad preferida, la densidad celular es de entre 5 - 20 millones de células / ml en el primer cambio de temperatura. En una modalidad especialmente preferida, la densidad celular es de entre 8 - 15 millones de células / ml en el primer cambio de temperatura. En algunas modalidades, el segundo cambio de temperatura se produce el día 7 $\pm$ 1 día. En algunas modalidades, la temperatura cambia luego otra vez a 31 °C. En algunas modalidades, este segundo cambio de temperatura se realiza alrededor del día 4 después del cambio inicial de temperatura.

Métodos de fabricación corriente abajo

En algunas modalidades, la cosecha de GL-2045 se logra por métodos de fabricación corriente abajo. En algunas modalidades, los métodos de fabricación corriente abajo se emplean en combinación con los métodos de fabricación corriente arriba optimizados descritos en la presente para retirar o aislar una fracción de proteína específica (por ejemplo, eliminación de agregados de alto peso molecular sin orden del homodímero de GL-2045). Como se usa en la presente, «métodos de fabricación corriente abajo» son etapas de purificación de proteínas y filtración realizadas en los sobrenadantes de proteínas para generar una composición de proteínas de una pureza y/o concentración deseadas. En algunas modalidades, los métodos de fabricación corriente

abajo se optimizaron para la purificación y filtración de GL-2045 para resultar en un perfil de multimerización particular de GL-2045 y/o mantenerlo, denominados en la presente «métodos de fabricación corriente abajo optimizados».

En algunas modalidades, GL-2045 se purifica por cromatografía de afinidad. En algunas modalidades, GL-2045 se purifica usando columnas de proteína A. Como se describe anteriormente, las columnas de proteína A son muy costosas y se reutilizan una cantidad considerable de veces para que se vuelvan económicamente viables. La reutilización de las columnas de proteína A necesita «regenerar» la columna de proteína A para mantener la capacidad de unión a la proteína. Como se usa en la presente, «regenerar» se refiere a retirar la proteína unida de la columna de proteína A que no se retiró durante el proceso de elución. En algunas modalidades, la columna de proteína A debe regenerarse más frecuentemente durante la purificación de GL-2045 que lo que se indica en las instrucciones del fabricante o más frecuentemente de lo que es normal en la técnica para purificar anticuerpos monoclonales o proteínas de fusión Fc. En algunas modalidades, la columna de proteína A debe regenerarse al menos dos veces más frecuentemente de lo recomendado por el fabricante. En modalidades adicionales, la columna de proteína A debe regenerarse entre cada ronda sucesiva de pasaje de sobrenadante de GL-2045 sobre la columna. En tales modalidades, la purificación de GL-2045 con una columna de afinidad de proteína A necesita el uso de un amortiguador de regeneración de alta rigurosidad para retirar los multímeros de GL-2045 unidos con avidéz de la columna de proteína A y regenerar la capacidad de unión total de la columna de proteína A. En modalidades preferidas, el amortiguador de regeneración de alta rigurosidad no provoca degradación de la columna de proteína A o está asociado con una pequeña degradación de la columna. En algunas modalidades, el amortiguador de regeneración de alta rigurosidad comprende una base soluble. En algunas modalidades, la base es hidróxido de sodio (NaOH). En algunas modalidades, el amortiguador de regeneración tiene una concentración de NaOH mayor que NaOH 0.3 M. Por ejemplo, el amortiguador de regeneración de alta rigurosidad puede ser mayor que 0.35 M, 0.4 M, 0.5 M, 0.6 M, 0.7 M, 0.8 M, 0.9 M, 1.0 M o más NaOH. En modalidades particulares, la concentración de NaOH en el amortiguador de regeneración es NaOH 0.5 M.

En algunas modalidades, la elución de GL-2045 de una columna de afinidad de proteína A se optimiza para retirar o reducir la cantidad de agregados sin orden y alto peso molecular de GL-2045 de la sustancia de fármaco. En algunas modalidades, GL-2045 se eluye de la columna de proteína A por un gradiente de elución (por ejemplo, un gradiente de elución de pH).

En algunas modalidades, los métodos de fabricación corriente abajo optimizados de GL-2045 comprenden un proceso de purificación de múltiples etapas que comprenden purificación por cromatografía de afinidad (por ejemplo, cromatografía de afinidad de proteína A) y al menos una o más etapas de pulido que se seleccionan de cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y columnas de interacción hidrofóbica. En una modalidad preferida, un proceso de purificación de cuatro etapas de GL-2045 se usa en vez del proceso de purificación de dos o tres etapas habitualmente puesto en práctica en la técnica, que comprende purificación por pulido de cromatografía de afinidad (por ejemplo, cromatografía de afinidad de proteína A), por cada una de cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de intercambio aniónico y columnas de interacción hidrofóbica. El término «pulido» se refiere clásicamente a la remoción por purificación posterior a la proteína A de las impurezas restantes inclusive agregados, endotoxina, ADN y/o virus. Además, respecto de GL-2045, «pulir» además significa controlar el porcentaje de homodímero y multímeros de orden superior específicos como mediante el uso de estas mismas técnicas cromatográficas.

En algunas modalidades, GL-2045 se pule por cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico o aniónico). En algunas modalidades, el pulido de GL-2045 por cromatografía de intercambio iónico se realiza con un amortiguador de elución que reduce y/o minimiza la cantidad de agregados de alto peso molecular sin orden del homodímero de GL-2045 que se retienen durante el proceso de purificación posterior a la proteína A. En algunas modalidades, la elución por etapas se realiza para eluir GL-2045 de la columna de proteína A. En algunas modalidades, una elución de gradiente se realiza para eluir GL-2045 de la columna de proteína A. En algunas modalidades, el amortiguador de elución es un amortiguador de acetato de sodio. En algunas modalidades, la concentración de acetato de sodio en el amortiguador de elución es al menos 25 mM. Por ejemplo, la concentración de acetato de sodio en el amortiguador de elución puede ser al menos 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 75, 100 mM o más de acetato de sodio. En algunas modalidades, el amortiguador de elución son 50 mM de acetato de sodio. En algunas modalidades, el amortiguador de elución es 50 mM de acetato de sodio con la adición de cantidades variables de un amortiguador de sal adicional (por ejemplo, amortiguador de NaCl). En algunas modalidades, el amortiguador adicional es un amortiguador de NaCl 1 M, pH 5 («amortiguador b»). En algunas modalidades, el amortiguador de elución comprende al menos 30 % de amortiguador B. En algunas modalidades, el amortiguador de elución comprende entre 30 % y 40 % de amortiguador B. En algunas modalidades, el amortiguador de elución comprende entre 35 % y 40 % de amortiguador B. En incluso modalidades adicionales, el amortiguador de elución

comprende entre 37 % y 39 % de amortiguador B. En algunas modalidades, el amortiguador de elución es 38 % +/- 0.5 % de amortiguador B.

En algunas modalidades, GL-2045 se puede usando cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).

En algunas modalidades, la columna de HIC se selecciona para retirar los agregados sin orden y de alto peso molecular de GL-2045 (por ejemplo, una columna de HIC de Octilo FF). Se puede realizar modo de paso de flujo o modo de unión para purificar GL-2045 con la columna de HIC. El experto en la técnica entiende que ajustar variables como el pH y las condiciones de sal determinará si GL-2045 se une a la resina de HIC o fluye a través de la columna. En algunas modalidades, la columna de HIC se selecciona para purificar una fracción específica de GL-2045, como el homodímero y/o los multímeros de orden superior (por ejemplo, columna de Butilo HP y/o Fenilo HP). En algunas modalidades, puede ser deseable aislar una fracción específica de GL-2045 para el tratamiento de una indicación de enfermedad particular. Por ejemplo, se pueden usar columnas de HIC para generar sustancias de fármaco que comprenden sustancialmente una fracción de GL-2045 específica (por ejemplo, una sustancia de fármaco que predominantemente comprende homodímeros de GL-2045, una sustancia de fármaco que comprende predominantemente dímeros de los homodímeros, una sustancia de fármaco que comprende predominantemente un multímero de orden superior de GL-2045, etc.). La separación de las fracciones de GL-2045 en productos separados puede ser ventajosa para ciertas indicaciones de enfermedad. Por ejemplo, el homodímero de GL-2045 se une a Fc γ RI pero se une sustancialmente a otros FcR. De este modo, el homodímero de GL-2045 puede ser especialmente útil en el tratamiento de enfermedades mediadas, al menos en parte, por la señalización de Fc γ RI, como peritonitis (Heller *et ál.*, J. Immunol, V. 162, 1992) o lesión pulmonar aguda (Xie *et ál.* J. Immunol., V 188, 2012). De manera similar, el trímero de GL-2045 y potencialmente el dímero y tetrámero, pueden ser particularmente útiles para tratar enfermedad autoinmunes (véase, WO 2015/168643). Debido a que C1q es hexamérico, el pentámero, hexámero y heptámeros pueden ser especialmente útiles en el tratamiento de enfermedades mediadas por el complemento. Un experto en la técnica reconocerá que estas son solo algunas formas en que las fracciones de GL-2045 pueden ser ventajosas para el tratamiento de ciertas enfermedades.

En algunas modalidades, los métodos de fabricación corriente abajo optimizados descritos en la presente pueden ser una combinación de técnicas de filtración y/o purificación individuales. Por ejemplo, en algunas modalidades, los métodos corriente abajo optimizados pueden comprender purificación de GL-2045 por cromatografía de afinidad (por ejemplo, purificación por métodos optimizados de columnas de proteína A) seguido de pulido adicional con métodos de

cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, pulido por métodos de intercambio catiónico optimizados) y/o columnas de interacción hidrofóbica. En algunas modalidades, los métodos corriente abajo optimizados descritos en la presente comprenden un proceso de purificación de cuatro etapas que incluyen purificación por proteína A, intercambio catiónico, paso de flujo de intercambio aniónico y columnas de interacción hidrofóbica. En algunas modalidades, también se pueden usar etapas de filtración de profundidad y/o ultrafiltración adicionales.

Por lo tanto, los términos «métodos de fabricación óptimos» o «métodos de fabricación optimizados» usados de manera intercambiable en la presente, pueden referirse a métodos de fabricación corriente arriba optimizados y/o corriente abajo optimizados. En algunas modalidades, los métodos de fabricación optimizados comprenden métodos corriente arriba y corriente abajo optimizados. De este modo, las expresiones «stradomer fabricado de forma óptima» o «GL-2045 fabricado de forma óptima», como se usan en la presente, se refieren a composiciones de GL-2045 dominantes de multímero de alto orden y alta titulación elaboradas de acuerdo con condiciones de fabricación corriente arriba optimizadas y/o métodos de fabricación corriente abajo optimizados. Si bien las composiciones de GL-2045 descritas en la presente pueden ser GL-2045 producido de forma óptima (es decir, GL-2045 hecho por los métodos descritos en la presente), un experto en la técnica comprenderá que las composiciones de GL-2045 que entran en los patrones de multímero definido descritos en la presente pueden lograrse por otros medios. Por lo tanto, una «composición de GL-2045» o «composición de GL-2045 recombinante» o «composición de GL-2045 purificado» se refiere a una composición que comprende GL-2045, inclusive una sustancia de fármaco de GL-2045, ya sea que la composición se hizo por métodos de fabricación óptimos o no. En la presente, los términos «patrón de multímero» o «patrón de bandas» o cualquier término similar se usan de manera intercambiable y se refieren al patrón de multímeros observados en un análisis analítico de una composición de GL-2045. Un ejemplo de patrón de multímero se muestra en la Figura 33. .

En algunas modalidades, en la presente se proporciona una composición de GL-2045 producido recombinantemente con un patrón de multímero definido. Como se usa en la presente, las expresiones «patrón de multímero definido» o «patrón de multimerización definido» o «patrón de bandas definido» se refieren a un patrón de multimerización de GL-2045 que se puede reproducir y puede describirse en términos del porcentaje de la composición de GL-2045 total presente como homodímeros, multímeros de orden superior y/o multímeros de orden máximo. Un experto en la técnica comprenderá que el valor absoluto de los porcentajes de homodímero y/o multímero puede variar en función del método analítico usado. A modo de ejemplo, el análisis de software digital de

un gel de SDS-PAGE proporcionará porcentajes de multímero algo diferentes en comparación con SEC-HPLC analítica de la composición idéntica. A menos que se especifique lo contrario, los porcentajes de homodímeros y multímeros de las composiciones de GL-2045 descritas en la presente se expresan como porcentajes medidos por métodos de SEC-HPLC analítica. En algunas modalidades, se proporciona un GL-2045 producido recombinantemente donde al menos 80 % de GL-2045 está presente como no homodímeros o «multímeros» (por ejemplo, dímeros de homodímeros, trímeros de homodímeros, etc.). En algunas modalidades, más del 80 % de GL-2045 está presente como multímeros. Por ejemplo, los métodos de fabricación optimizados, como los descritos en la presente, pueden resultar en una composición de proteína GL-2045 donde 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más de GL-2045 está presente como multímeros. En algunas modalidades, al menos 30 % de GL-2045 está presente como «multímeros de orden máximo», definido en la presente como el 7-mer del homodímero y más. En algunas modalidades, no más del 40 % del GL-2045 producido recombinantemente está presente como multímeros de orden máximo. Un experto en la técnica también comprenderá que cuando se habla de «bandas» o «fracciones», a menos que se especifique otra cosa, la cantidad de bandas connota la cantidad de homodímeros presentes en la fracción. Por lo tanto, por ejemplo, la banda 2 comprende el dímero del homodímero mientras que la banda 3 comprende el trímero del homodímero. Por lo tanto, por ejemplo, la banda 2 comprende el dímero del homodímero, la banda 3 comprende el trímero del homodímero, la banda 4 comprende el tetrámero del homodímero. etc.

Como se usa en la presente, la expresión «multímeros de orden superior» se refiere a los trímeros del homodímero y más (es decir, multímeros presentes en la fracción 3 y más). Como se usa en la presente, la expresión «multímeros de orden máximo» se refiere a los multímeros en la fracción 7 y más, o fracciones que incluyen el 7-mer del homodímero y más.

En algunas modalidades, se proporciona una composición de GL-2045 producido recombinantemente, donde la fracción homodimérica comprende menos que alrededor de 20 % de la composición total. En algunas modalidades, la fracción homodimérica comprende alrededor de 12 % a alrededor de 19 %, alrededor de 14 % a alrededor de 19 %, alrededor de 15.5 % a alrededor de 17.5 % o alrededor de 14 % a alrededor de 18.5 % de la composición de proteína total. En algunas modalidades, la fracción homodimérica comprende alrededor de 15.9 % o alrededor de 16.2 % de la composición de proteína total.

En algunas modalidades, se proporciona una composición de GL-2045 producido recombinantemente donde el dímero de la fracción de homodímero comprende alrededor de 7 % a alrededor de 13 %, alrededor de 7 % a alrededor de 12.5 %, alrededor de 7 % a alrededor de 12

%, alrededor de 9 % a alrededor de 11 % o alrededor de 9.1 % a alrededor de 11.7 % de la composición total. En algunas modalidades, el dímero de la fracción de homodímero comprende alrededor de 10 % a alrededor de 10.6 % de la composición de proteína total.

5 En algunas modalidades, se proporciona una composición de GL-2045 producido recombinantemente, donde el trímero de la fracción de homodímero comprende alrededor de 5.5 % a alrededor de 11 %, alrededor de 5.5 % a alrededor de 10 % o alrededor de 6.5 % a alrededor de 8 % de la composición total. En algunas modalidades, el trímero de la fracción de homodímero comprende alrededor de 7 % a alrededor de 7.3 % de la composición de proteína total.

10 En algunas modalidades, se proporciona una composición de GL-2045 producido recombinantemente donde el tetrámero de la fracción de homodímero comprende alrededor de 10 % a alrededor de 16%, alrededor de 11 % a alrededor de 16 %, alrededor de 13 % a alrededor de 15 % o alrededor de 12.4 % a alrededor de 15.1 % de la composición total. En algunas modalidades, el tetrámero de la fracción de homodímero comprende alrededor de 14 % a alrededor de 14.3 % de la composición de proteína total.

15 En algunas modalidades, se proporciona una composición de GL-2045 producido recombinantemente, donde el pentámero de la fracción de homodímero comprende alrededor de 6 % a alrededor de 9 %, alrededor de 7 % a alrededor de 8 % o alrededor de 7.1 % a alrededor de 8.2 % de la composición total. En algunas modalidades, el dímero de la fracción de pentámero comprende alrededor de 7 % a alrededor de 7.5 % de la composición de proteína total.

20 En algunas modalidades, se proporciona una composición de GL-2045 producido recombinantemente, donde el hexámero de la fracción de homodímero comprende alrededor de 10 % a alrededor de 14 %, alrededor de 12 % a alrededor de 13 % o alrededor de 12.1 % a alrededor de 13.2 % de la composición total. En algunas modalidades, el hexámero de la fracción de homodímero comprende alrededor de 12.7 % a alrededor de 12.6 % de la composición de proteína
25 total.

En algunas modalidades, se proporciona una composición de GL-2045 producido recombinantemente, donde la fracción de multímero de orden máximo comprende al menos alrededor de 28 % de la composición total. En algunas modalidades, la fracción de multímero de orden máximo no comprende más que alrededor de 35 % de la composición de proteína total. En
30 algunas modalidades, las fracciones de multímero de orden máximo comprenden alrededor de 30 % a alrededor de 34 % o alrededor de 28.6 % a alrededor de 35.1 % de la composición de proteína total. En algunas modalidades, la fracción de multímero de orden máximo comprende alrededor de 31.4 % o alrededor de 31.9 % de la composición de proteína total. En algunas modalidades, se

proporciona una composición de GL-2045 producido recombinantemente donde la fracción homodimérica comprende menos que alrededor de 20 % de la composición total; las fracciones de multímero de orden máximo comprenden al menos alrededor de 28 % de la composición total; el dímero de la fracción de homodímero comprende de alrededor de 7 % a alrededor de 13 % de la composición total; el trímero de la fracción de homodímero comprende de alrededor de 5 % a alrededor de 11 % de la composición total; el tetrámero de la fracción de homodímero comprende de alrededor de 10 % a alrededor de 16 % de la composición total; el pentámero de la fracción de homodímero comprende de alrededor de 6 % a alrededor de 10 % de la composición total; el hexámero de la fracción de homodímero comprende de alrededor de 10 % a alrededor de 14 % de la fracción total; el dímero del homodímero al hexámero de la fracción de homodímero comprende de alrededor de 40 % a alrededor de 60 % de la composición total; el trímero del homodímero al hexámero de la fracción de homodímeros comprende de alrededor de 32 % a alrededor de 50 % de la composición total; el tetrámero del homodímero al hexámero de la fracción de homodímero comprende de alrededor de 30 % a alrededor de 37 % de la composición total; el pentámero del homodímero al hexámero de la fracción de homodímero comprende de alrededor de 18 % a alrededor de 23 % de la composición total o cualquier combinación de lo que antecede.

En algunas modalidades, se proporciona una composición de GL-2045 producido recombinantemente, donde aproximadamente 80 % de la composición de GL-2045 total comprende el dímero del homodímero y más (es decir, banda 2 y más). En algunas modalidades, aproximadamente 60-80 %, 62-80 % o 60-78 % de la composición de GL-2045 producido recombinantemente total comprende el trímero del homodímero y más (es decir, bandas 3 y más). En algunas modalidades, alrededor de 54-76 %, alrededor de 54-72 alrededor de 56-76 % o alrededor de 54-67 % de la composición de GL-2045 producido recombinantemente total comprende el tetrámero y más (es decir, bandas 4 y más). En algunas modalidades, se proporciona una composición de GL-2045, donde aproximadamente 44-60 %, 44-57 % o 44-51 % de la composición total comprende el pentámero y más (es decir, bandas 5 y más). En algunas modalidades, se proporciona una composición de GL-2045 donde aproximadamente 38-51 % de la composición total comprende el hexámero y más (es decir, bandas 6 y más).

En algunas modalidades, se proporciona un GL-2045 producido recombinantemente donde las bandas 2-6 de la composición (es decir, el dímero del homodímero al hexámero del homodímero) comprenden alrededor de 39-61 % o alrededor de 44-60 % de la composición. En algunas modalidades, se proporciona un GL-2045 producido recombinantemente, donde las bandas 3-6 de la composición (es decir, el trímero del homodímero al hexámero del homodímero) comprenden

alrededor de 32-50 % o alrededor de 35-48 % de la composición. En algunas modalidades, se proporciona un GL-2045 producido recombinantemente donde las bandas 4-6 de la composición (es decir, el tetrámero del homodímero al hexámero del homodímero) comprenden alrededor de 26-39 % o alrededor de 30-39 % de la composición. En algunas modalidades, se proporciona un GL-2045 producido recombinantemente donde las bandas 5-6 de la composición (es decir, el pentámero del homodímero al hexámero del homodímero) comprenden alrededor de 16-23 % o alrededor de 18-23 % de la composición.

Sin limitarse por la teoría, los componentes menos activos de GL-2045 para unirse a receptores Fc de baja afinidad y a C1q son el homodímero y el dímero del homodímero. Un experto en la técnica comprenderá fácilmente que se pueden usar los métodos cromatográficos optimizados descritos en la presente, o técnicas de purificación similares, para reducir la cantidad de homodímero u homodímero y dímero en el producto final. Por lo tanto, el experto en la técnica sabrá que hacer esto alterará los porcentajes de los multímeros descritos en la presente. A modo de ejemplo y sin limitar la generalidad de lo que antecede, si el experto en la técnica retirara 50 % del homodímero en el proceso de purificación, o el homodímero y el dímero, el porcentaje de cada multímero restante (es decir, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros 7-mer, etc.) aumentaría conforme a esto. Retirar 90 % del homodímero y 50 % del dímero reducirá la proteína total presente en el producto final en aproximadamente 20 % +/-5 % y, por lo tanto, aumentará los porcentajes del trímero, tetrámero, pentámero, hexámero y 7-mer representados como porcentaje de la proteína total.

Es más, un experto en la técnica también reconocerá que las técnicas de cromatografía actuales no permiten generalmente retirar ni reducir una única banda de multímero, como los multímeros de orden máximo, sin retirar simultáneamente, en cierta medida, las bandas adyacentes, como el hexámero y en menor medida el pentámero. Por lo tanto, el experto en la técnica sabrá que el aumento compensatorio observado en el porcentaje de cualquier multímero u homodímero dado como resultado de retirar o reducir los multímeros de orden máximo aumentará en mayor medida cuanto más lejos esté el multímero dado de la fracción de GL-2045 que se retira (por ejemplo, el porcentaje del homodímero aumentará en mayor medida que el porcentaje aumentado observado para los hexámeros cuando los multímeros de orden máximo se retiran o reducen). En cualquier caso, el aumento acumulativo en porcentajes de multímero de los multímeros restantes debería ser igual al porcentaje de multímeros para las fracciones retiradas, sujeto a cierta variabilidad atribuible al método analítico.

Composiciones farmacéuticas

La administración de las composiciones de GL-2045 descritas en la presente se realizará a través de cualquier vía común, por vía oral, parenteral o tópica. Las vías ejemplares incluyen, entre otras, oral, nasal, bucal, rectal, vaginal, oftálmica, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, intraarterial, intratumoral, espinal, intratecal, intraarticular, intraarterial, subaracnoidea, sublingual, mucosa oral, bronquial, linfática, intrauterina, subcutánea, intratumoral, integrada en un dispositivo implantable como una sutura o en un dispositivo implantable como un polímero implantable, intradural, intracortical o dérmica. Dichas composiciones se administrarán normalmente como composiciones farmacéuticamente aceptables según se describen en la presente. En una modalidad preferida, el stradomer aislado fabricado de forma óptima se administra por vía intravenosa o subcutánea.

El término «portador farmacéuticamente aceptable», según se emplea en la presente, incluye cualesquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retardan la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los vectores o células de la presente invención, su uso en composiciones terapéuticas se considera. También se pueden incorporar ingrediente activos complementarios en las composiciones.

Las composiciones de GL-2045 de la presente invención se pueden formular en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) que se forman con ácidos inorgánicos como, por ejemplo, ácidos clorhídricos o fosfóricos, o ácidos orgánicos como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de las bases inorgánicas como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos y bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando el GL-2045 fabricado de forma óptima en la cantidad necesaria en el disolvente adecuado con varios de los ingredientes adicionales enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido por esterilización filtrada. En algunas modalidades, las soluciones inyectables estériles están formuladas para la administración intramuscular, subcutánea o intravenosa. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y otros ingredientes necesarios de los enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos

de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilizado que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución filtrada previamente en condiciones estériles del mismo.

Además, una modalidad es una composición de GL-2045 adecuada para la administración oral y se proporciona en un portador farmacéuticamente aceptable con o sin un diluyente inerte. El portador debe ser asimilable o comestible e incluye portadores líquidos, semisólidos (por ejemplo, pastas) o sólidos. Salvo que algún medio, agente, diluyente o portador convencional sea perjudicial para el receptor o para la eficacia terapéutica de una preparación de stradomer fabricado de forma óptima contenida allí, su uso en una composición de stradomer fabricado de forma óptima administrable por vía oral para utilizar en la práctica de los métodos de la presente invención es adecuado. Algunos ejemplos de portadores o diluyentes incluyen grasas, aceites, agua, soluciones salinas, lípidos, liposomas, resinas, aglutinantes, rellenos y similares, o combinaciones de estos. El término «administración oral», según se emplea en la presente, incluye la administración oral, bucal, enteral o intragástrica.

En una modalidad, la composición de GL-2045 se combina con el portador de cualquier manera conveniente y práctica, es decir, mediante solución, suspensión, emulsificación, mezcla, encapsulamiento, microencapsulamiento, absorción y similares. Estos procedimientos son de rutina para los expertos en la técnica.

En una modalidad específica, la composición de GL-2045 en forma de polvo se combina o se mezcla bien con un portador semisólido o sólido. La mezcla se puede realizar de cualquier manera adecuada, como la molienda. También se pueden añadir agentes estabilizadores en el proceso de mezcla para proteger la composición de la pérdida de la actividad terapéutica (por ejemplo, mediante la desnaturalización en el estómago). Algunos ejemplos de estabilizadores para utilizar en una composición administrable por vía oral incluyen amortiguadores, antagonistas de la secreción de ácidos estomacales, aminoácidos como glicina y lisina, carbohidratos como dextrosa, manosa, galactosa, fructosa, lactosa, sucrosa, maltosa, sorbitol, manitol, etc., inhibidores de la enzima proteolítica y similares. Más preferentemente, para una composición administrada por vía oral, el estabilizador también puede incluir antagonistas de la secreción de ácidos estomacales.

Además, la composición de GL-2045 para administración oral que se combina con un portador semisólido o sólido se puede formular, adicionalmente, en cápsulas de gelatina duras o blandas, comprimidos o píldoras. Más preferentemente, las cápsulas de gelatina, los comprimidos o las píldoras tienen recubrimiento entérico. Los recubrimientos entéricos impiden la desnaturalización de la composición en el estómago o en el intestino superior cuando el pH es ácido. Véase la

patente estadounidense n.º 5,629,001. Al llegar al intestino delgado, el pH básico en su interior disuelve el recubrimiento y permite que la composición se libere para interactuar con las células intestinales, p. ej., células M de parche de Peyer.

En otra modalidad, la composición de GL-2045 en forma de polvo se combina o se mezcla bien con materiales que crean una nanopartícula que encapsulan el biomimético inmunológicamente activo o a los cuales el biomimético inmunológicamente activo está unido. Cada nanopartícula tendrá un tamaño igual o inferior a 100 micrones. La nanopartícula puede tener propiedades mucoadhesivas que permiten la absorción gastrointestinal de un biomimético inmunológicamente activo que de otro modo no estaría biodisponible en forma oral.

En otra modalidad, se combina una composición en polvo con un portador líquido como agua o una solución salina, con o sin un agente estabilizador.

Una formulación de GL-2045 específica que se puede utilizar es una solución de proteína biomimética inmunológicamente activa en un amortiguador basado en fosfato hipotónico que carece de potasio donde la composición del amortiguador es la siguiente: 6 mM de fosfato de sodio monobásico monohidrato, 9 mM de fosfato de sodio dibásico heptahidrato, 50 mM de cloruro de sodio, pH 7.0.+/- 0.1. La concentración de la proteína biomimética inmunológicamente activa en un amortiguador hipotónico puede variar de 10 µg/mL a 100 mg/mL. Esta formulación se puede administrar a través de cualquier vía de administración, por ejemplo, de modo no taxativo, administración intravenosa.

Además, una composición de GL-2045 para administración tópica que se combina con un portador semisólido se puede formular adicionalmente en una crema o ungüento en gel. Un portador preferido para la formación de un ungüento en gel es un polímero en gel. Los polímeros preferidos que se utilizan para fabricar una composición de gel de la presente invención incluyen, entre otros, carbopol, carboximetilcelulosa y polímeros plurónicos. Específicamente, se combina una composición de multímero de Fc en polvo con un gel acuoso que contiene un agente de polimerización como Carbopol 980 en concentraciones de entre 0.5 % y 5 % p/volumen para la aplicación a la piel para el tratamiento de enfermedades en la piel o debajo de esta. El término «administración tópica», según se emplea en la presente, incluye la aplicación a una superficie dérmica, epidérmica, subcutánea o de la mucosa.

Además, una composición de GL-2045 se puede formular en un polímero para implante subcutáneo o subdérmico. Una formulación preferida para el polímero impregnado en fármaco implantable es un agente generalmente visto como seguro y puede incluir, por ejemplo, dextrano reticulado (Samantha Hart, Master of Science Thesis, "Elution of Antibiotics from a Novel Cross-

Linked Dextran Gel: Quantification» Virginia Polytechnic Institute and State University, 8 de junio de 2009) dextrano-tiramina (Jin, *et ál.* (2010) *Tissue Eng. Parte A.* 16(8):2429-40), dextrano-polietilenglicol (Jukes, *et ál.* (2010) *Tissue Eng. Parte A.* 16(2):565-73), o dextrano-glutaraldehído (Brondsted, *et ál.* (1998) *J. Controlled Release*, 53:7-13). Los expertos en la técnica sabrán que se pueden formar muchos polímeros e hidrogeles similares mediante la incorporación del stradomer fijado dentro del polímero o el hidrogel y el control del tamaño del poro hasta el diámetro deseado.

Tras la formulación, las soluciones se administran de un modo compatible con la formulación de dosificación y en la cantidad que resulte terapéuticamente eficaz para producir una mejora o alivio de los síntomas. Las formulaciones se administran fácilmente en diversas formas de dosificación como soluciones que se pueden ingerir, cápsulas de liberación de fármaco y similares. Se puede producir algo de variación en la dosificación según la afección del sujeto que se esté tratando. La persona responsable de la administración puede, en cualquier caso, determinar la dosis adecuada para el sujeto individual. Además, para la administración a seres humanos, las preparaciones cumplirán con los estándares de esterilidad, seguridad y pureza general, como lo requieren los estándares del Centro para la Evaluación e Investigación Biológica de la FDA.

La vía de administración variará, naturalmente, según la ubicación y la naturaleza de la enfermedad que se esté tratando, y puede incluir, por ejemplo, administración intradérmica, transdérmica, subdérmica, parenteral, nasal, intravenosa, intramuscular, intranasal, subcutánea, percutánea, intratraqueal, intraperitoneal, intratumoral, perfusión, lavado, inyección directa, intrarectal y oral.

En una modalidad, la composición de GL-2045 se administra de forma intravenosa, subcutánea, oral, intraperitoneal, sublingual, bucal, transdérmica, rectal, mediante implante subdérmico o intramuscular. En modalidades particulares, el stradomer fabricado de forma óptima se administra de forma intravenosa, subcutánea o intramuscular. En una modalidad, el stradomer fabricado de forma óptima se administra a una dosis de alrededor de 0.005 mg/Kg a alrededor de 1000 mg/Kg. En otra modalidad, el stradomer fabricado de forma óptima se administra a alrededor de 0.01 mg/Kg a alrededor de 100 mg/Kg. En aun otra modalidad, el stradomer fabricado de forma óptima se administra a alrededor de 0.1 mg/Kg a alrededor de 20 mg/Kg. En aun otra modalidad, el stradomer fabricado de forma óptima se administra a alrededor de 1 mg/Kg a alrededor de 10 mg/Kg. En aun otra modalidad, el stradomer fabricado de forma óptima se administra a alrededor de 2 mg/Kg a alrededor de 5 mg/Kg. El stradomer fabricado de forma óptima se puede administrar al menos una vez al día, semanalmente, cada dos semanas, una vez por mes o a veces a mayores intervalos. Se puede utilizar un régimen de dosificación bifásica donde la primera fase de

dosificación comprende entre aproximadamente el 0.1 % y aproximadamente el 300 % de la segunda fase de dosificación.

En otra modalidad, la composición de GL-2045 se administra antes, durante o después de la administración de uno o más agentes farmacéuticos y/o terapéuticos adicionales. En otra

5 modalidad, el agente farmacéuticamente activo adicional comprende un esteroide; un fármaco anti-autoinmune biológico como un anticuerpo monoclonal, una proteína de fusión o una anti-citocina; un fármaco anti-autoinmune no biológico; un inmunosupresor; un antibiótico; y un agente antiviral; una citocina; o un agente de otro modo capaz de actuar como un modulador inmune. En otra modalidad, el esteroide es prednisona, prednisolona, cortisona, dexametasona, mometasona
10 testosterona, estrógeno, oxandrolona, fluticasona, budesónida, beclametasona, albuterol o levalbuterol. En aun una modalidad adicional, el anticuerpo monoclonal es eculizumab, ocrelizumab, infliximab, adalimumab, rituximab, tocilizumab, golimumab, ofatumumab, LY2127399, belimumab, veltuzumab, mepolizumab, necitumumab, nivolumab, dinutuximab, secukinumab, evolocumab, blinatumomab, pembrolizumab, ramucirumab, vedolizumab, siltuximab,
15 obinutuzumab, adotrastuzumab, raxibacumab, pertuzumab, brentuximab, ipilimumab, denosumab, canakinumab, ustekinumab, catumaxomab, ranibizumab, panitumumab, natalizumab, bevacizumab, cetuximab, efalizumab, omalizumab, tolitumomab-1131, alemtuzumab, gemtuzumab, trastuzumab, palivizumab, basilixumab, daclizumab, abciximab, murononumab, vedotin, ibritumomab tiuxetan, motavizumab o certolizumab. En aun otra modalidad, la proteína de fusión
20 es etanercept o abatacept. En aun otra modalidad, el agente biológico anti-citocina es anakinra. En una modalidad adicional, el fármaco agente no biológico antirreumático es ciclofosfamida, metotrexato, azatioprina, hidroxiclороquina, leflunomida, minociclina, compuestos de oro orgánico, fostamatinib, tofacitinib, etoricoxib o sulfasalazina. En una modalidad adicional, el inmunosupresor es ciclosporina A, tacrolimus, sirolimus, mofetil micofenolato, everolimus, OKT3, globulina antitimocítica, basiliximab, daclizumumab o alemtuzumab. En otra modalidad, el stradomer
25 fabricado de forma óptima se administra antes, durante o después de la administración de un agente quimioterapéutico. En otra modalidad, el stradomer fabricado de forma óptima y el agente terapéutico adicional presentan sinergia terapéutica cuando se administran juntos. En una modalidad, el stradomer fabricado de forma óptima se administra antes de la administración del
30 agente terapéutico adicional. En otra modalidad, el stradomer fabricado de forma óptima se administra al mismo tiempo que la administración del agente terapéutico adicional. En otra modalidad, el stradomer fabricado de forma óptima se administra después de la administración del agente terapéutico adicional.

En una modalidad, la composición de GL-2045 se administra sujeta de forma covalente a un dispositivo implantable. En una modalidad, el stradomer fabricado de forma óptima está sujeto a una sutura. En otra modalidad, el stradomer fabricado de forma óptima está sujeto a un injerto o stent. En otra modalidad, el stradomer fabricado de forma óptima se sujeta a una válvula de corazón, un reemplazo de articulación ortopédica, o conector electrónico implantado. En otra modalidad, el stradomer fabricado de forma óptima está sujeto e incrustado dentro de una matriz implantable. En una modalidad preferida, el stradomer fabricado de forma óptima está sujeto e incrustado dentro de un hidrogel implantable. En una modalidad, el hidrogel comprende dextrano, alcohol polivinílico, poliacrilato de sodio o polímeros de acrilato. En una modalidad adicional, el stradomer fabricado de forma óptima se administra sujeta en un hidrogel con tamaños de poro lo suficientemente grandes para permitir la entrada de células inmunes para que interactúen con el stradomer sujeto y luego regresen a circulación. En una modalidad adicional, el tamaño del poro del hidrogel es 5 a 50 micrones. En una modalidad preferida, el tamaño del poro del hidrogel es 25 – 30 micrones.

En otra modalidad, la composición de GL-2045 se administra para tratar seres humanos, primates no humanos (por ejemplo, monos, babuinos y chimpancés), ratones, ratas, bovinos, caballos, gatos, perros, cerdos, conejos, cabras, ciervos, ovejas, hurones, jerbos, conejillos de indias, hámsters, murciélagos, aves (por ejemplo, pollos, pavos y patos), peces y reptiles con moléculas de stradomer químicas o específicas de la especie. En otra modalidad, el ser humano es un adulto o un niño. En incluso otra modalidad, el stradomer fabricado de forma óptima se administra para prevenir una enfermedad mediada por complemento. En otra modalidad, el stradomer se administra para prevenir afecciones autoinmunes asociadas con vacunas en animales de compañía y en el ganado.

El término «administración parenteral», según se emplea en la presente, incluye cualquier forma de administración en la cual el compuesto sea absorbido por el sujeto sin implicar la absorción a través de los intestinos. Algunas vías de administración parenteral ejemplares que se emplean en la presente invención incluyen, entre otras, la administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intratumoral, intraocular, nasal o intraarticular.

Además, la composición de GL-2045 de la presente invención se puede administrar, opcionalmente, antes, durante o después de otro agente farmacéutico.

A continuación se presentan ejemplos específicos de diversas categorías de formulaciones farmacéuticas y las vías de administración preferidas, según se indican, para enfermedades ejemplares específicas:

Comprimido soluble sublingual o bucal: angina, poliarteritis nodosa.

Intravenosa, intramuscular o subcutánea: miastenia gravis, síndrome urémico hemolítico (HUS), síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), nefropatía membranosa, neuromielitis óptica, rechazo de aloinjertos mediado por anticuerpos, nefritis lúpica, glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN), púrpura trombocitopénica idiopática, miositis por cuerpos de inclusión, polineuropatía desmielinizante de IgM paraproteinémica, fascitis necrotizante, pénfigo, gangrena, dermatomiositis, granuloma, linfoma, sepsis, anemia aplásica, fallo de órganos multisistémico, mieloma múltiple, gammopatía monoclonal de significado incierto, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, miopatías inflamatorias, púrpura trombocitopénica trombótica, miositis, anemia, neoplasia, anemia hemolítica, encefalitis, mielitis, mielopatía asociada especialmente con el virus linfotrópico humano 1 de linfocitos T, leucemia, esclerosis múltiple y neuritis óptica, asma, necrólisis epidérmica, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, neuropatía, uveítis, síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de injerto contra hospedador, síndrome de la persona rígida, deterioro cerebelar paraneoplásico con anticuerpos anti-Yo, encefalomielitis paraneoplásica y neuropatía sensorial con anticuerpos anti-Hu, vasculitis sistémica, lupus eritematoso sistémico, neuropatía diabética autoinmune, neuropatía disautonómica idiopática aguda, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada, neuropatía motora multifocal, síndrome de la motoneurona inferior asociado con anti-/GM1, desmielinización, glomerulonefritis membranoproliferativa, cardiomiopatía, enfermedad de Kawasaki, artritis reumatoide y síndrome de Evan, CIDP, MS, dermatomiositis, distrofia muscular. El término «administración intravenosa», según se emplea en la presente, incluye todas las técnicas para suministrar un compuesto o composición de la presente invención a la circulación sistémica a través de una inyección o infusión intravenosa.

Gel, loción, crema o parche dérmico: vitiligo, herpes zoster, acné, quelitis.

Supositorio, gel o infusión rectal: colitis ulcerativa, inflamación hemorroidal.

Oral como píldora, pastilla, encapsulada o con recubrimiento entérico: enfermedad de Crohn, esprúe celíaco, síndrome del intestino irritable, enfermedad inflamatoria del hígado, esófago de Barrett.

Intracortical: epilepsia, Alzheimer, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington.

Infusión o implante intraabdominal: endometriosis.

Dispositivos médicos: recubiertos sobre un stent de arteria coronaria, articulaciones protéticas.

Aplicaciones terapéuticas de GL-2045 fabricado de forma óptima

En una modalidad, se proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección como una enfermedad autoinmune, enfermedad inflamatoria o afección o enfermedad mediada por el complemento.

- 5 Según el diseño racional y validaciones *in vitro* e *in vivo*, los GL-2045 elaborados de forma óptima de la presente invención servirán como importantes biofarmacéuticos para el tratamiento de trastornos y enfermedades inflamatorias, así como para modificar la función inmune en una diversidad de otros contextos tales como bioinmunoterapia para alergias, cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades infecciosas y enfermedades inflamatorias. Las afecciones médicas
- 10 adecuadas para el tratamiento con el GL-2045 fabricado de forma óptima e inmunológicamente activo descrito en la presente incluyen cualquier enfermedad causada o asociada con activación de complemento o funciones efectoras mediadas por complemento, que incluyen actividad de complemento aumentada o inapropiada. Tales afecciones médicas incluyen aquellas que están actualmente o han sido previamente tratadas con los fármacos de unión al complemento como
- 15 eculizumab. El eculizumab se une a la proteína de complemento C5 (una proteína de complemento que está corriente abajo respecto de C1 y C1q en la vía de complemento clásica), inhibiendo su escisión y posterior lisis celular mediada por complemento. La biomimética de la presente invención proporciona una alternativa segura y eficaz a otros fármacos de unión al complemento conocidos en la técnica. Por ejemplo, en algunas modalidades, la biomimética de la
- 20 presente invención se une a C1q, la primera subunidad en el complejo C1 de la vía de complemento clásica. Las afecciones médicas adecuadas para su tratamiento con los stradomers elaborados de forma óptima e inmunológicamente activos incluyen, de modo no taxativo, miastenia gravis, síndrome urémico hemolítico (HUS), síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), hemoglobinuria paroxística nocturna (PNH), neuropatía membranosa, neuromielitis óptica, rechazo
- 25 de aloinjertos mediado por anticuerpos, nefritis lúpica, deterioro macular, anemia de células falciformes y glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN). Las afecciones médicas adicionales adecuadas para el tratamiento con el GL-2045 fabricado de forma óptima e inmunológicamente activo descrito en la presente incluyen aquellas que se tratan actualmente en forma rutinaria con terapias ampliamente inmunosupresoras, inclusive hIVIG, o en las cuales se ha descubierto que
- 30 hIVIG es útil desde el punto de vista clínico como citopenias autoinmunes, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, síndrome de Guillain-Barre, miastenia gravis, enfermedad autoinmune anti-Factor VIII, dermatomiositis, vasculitis y uveítis (véase van der Meche et ál., N. Engl. J. Med. 326, 1123 (1992); P. Gajdos et ál, Lancet i, 406 (1984); Y. Sultan, M. et ál, Lancet ii,

765 (1984); M. C. Dalakas *et ál.*, N. Engl. J. Med. 329, 1993 (1993); D. R. Jayne *et ál.*, Lancet 337, 1137 (1991); P. LeHoang, *et ál.*, Ocul. Immunol. Inflamm. 8, 49 (2000)) y aquellos cánceres o afecciones de enfermedad inflamatoria en la que un anticuerpo monoclonal se puede utilizar o ya se encuentra en uso clínico. Las condiciones incluidas entre aquellas que pueden ser eficazmente tratadas por los compuestos que son el objetivo de esta invención incluyen una enfermedad inflamatoria con un desequilibrio en las redes de citocina, un trastorno autoinmuntario mediado por autoanticuerpos patogénicos o linfocitos T autoagresivos, o una fase aguda o crónica de una enfermedad o proceso crónico recidivante autoinmuntario, inflamatorio o infeccioso.

Además, otras afecciones médicas con un componente inflamatorio que implica el complemento se beneficiarán del tratamiento con composiciones de GL-2045 como asma, lupus eritematoso, glomerulonefritis, nefropatía glomerular, artritis, enfermedades mediadas por autoanticuerpos inclusive anemia hemolítica autoinmune y enfermedad cardíaca autoinmune, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad intestinal inflamatoria, hemoglobinuria nocturna paroxismal, síndrome urémico hemolítico atípico, lesiones por isquemia reperusión que incluyen como ejemplos infarto del miocardio, lesión de la médula espinal, y apoplejía, rechazo de órganos trasplantados o sangre, Hepatitis B, Hepatitis C, inflamación asociada con el virus de inmunodeficiencia humana, adrenoleucodistrofia y trastornos epilépticos especialmente los que se cree que están asociados con encefalitis postviral inclusive síndrome de Rasmussen, síndrome de West y síndrome de Lennox-Gastaut.

El enfoque general de la terapia que utiliza la composición de GL-2045 descrita en la presente es administrarle a un sujeto que tiene una enfermedad o afección, una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de GL-2045 para efectuar un tratamiento. En algunas modalidades, las enfermedades o afecciones se pueden categorizar ampliamente como enfermedades inflamatorias con un desequilibrio de las redes de citocinas, un trastorno autoinmune mediado por autoanticuerpos patogénicos o células T autoagresivas o una fase aguda o crónica de una enfermedad o proceso recidivante crónico.

Los términos «tratar» y «tratamiento», según se emplean en la presente, se refieren a la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un stradomer fabricado de forma óptima de la presente invención de modo que el sujeto tenga una mejora en una enfermedad o afección, o en un síntoma de la enfermedad o afección. La mejora es cualquier mejora o alivio de la enfermedad o afección, o de los síntomas de la enfermedad o afección. La mejora es una mejora observable o medible, o puede ser una mejora en la sensación general de

- bienestar del sujeto. Por ende, los expertos en la técnica advierten que un tratamiento puede mejorar la condición de enfermedad, pero puede no representar una cura total de la enfermedad. Específicamente, las mejoras en los sujetos pueden incluir uno o más de: disminución de la inflamación; disminución de marcadores inflamatorios de laboratorio como la proteína C reactiva;
- 5 disminución de la autoinmunidad comprobada por uno o más de mejoras en los marcadores autoinmunes como el recuento de autoanticuerpos o plaquetas, recuento de glóbulos blancos o recuento de glóbulos rojos, disminución del sarpullido o púrpura, disminución de la debilidad, entumecimiento u hormigueo, aumento de los niveles de glucosa en los pacientes con hiperglicemia, disminución del dolor, inflamación, hinchazón o degradación de las articulaciones,
- 10 disminución de la frecuencia y el volumen de cólicos y diarreas, disminución de la angina, disminución de la inflamación de los tejidos o disminución de la frecuencia de las apoplejías; disminuciones de la carga tumoral cancerosa, aumento del tiempo para el avance del tumor, disminución del dolor por cáncer, aumento de la supervivencia o mejoras en la calidad de vida; o retraso del avance o mejora de la osteoporosis.
- 15 El término «cantidad terapéuticamente eficaz» tal como se usa en la presente, se refiere a una cantidad que produce una mejora o alivio de los síntomas de la enfermedad o afección. Un experto en la técnica comprenderá que la cantidad terapéuticamente eficaz del GL-2045 producido en la presente puede variar dependiendo de la sustancia de fármaco final. Por lo tanto, por ejemplo, si se quiere eliminar todos los multímeros de orden inferior, es concebible que se pueda necesitar
- 20 una menor dosis de los multímeros de orden superior resultantes. De este modo, hay más de una «dosis terapéuticamente eficaz» de GL-2045.
- Según se emplea en la presente, «profilaxis» puede significar la prevención completa de los síntomas de una enfermedad, un retraso en la aparición de los síntomas de una enfermedad o una disminución de la gravedad de los síntomas de la enfermedad desarrollados posteriormente.
- 25 El término «sujeto» tal como se usa en la presente, significa cualquier sujeto mamífero al cual se le administran stradomers fabricados de forma óptima de la presente invención de acuerdo con los métodos descritos en la presente. En una modalidad específica, los métodos de la presente descripción se emplean para tratar a un sujeto humano. Los métodos de la presente descripción también se pueden utilizar para tratar a primates no humanos (por ejemplo, monos, babuinos y
- 30 chimpancés), ratones, ratas, bovinos, caballos, gatos, perros, cerdos, conejos, cabras, ciervos, ovejas, hurones, jerbos, conejillos de indias, hámsters, murciélagos, aves (por ejemplo, pollos, pavos y patos), peces y reptiles para producir moléculas de stradomer quiméricas o específicas de las especies.

Se ha demostrado que la inhibición del complemento disminuye las enfermedades mediadas por anticuerpos (véase, por ejemplo, Stegall *et ál.*, American Journal of Transplantation noviembre de 2011; 11(1):2405-2413-Epub 2011 setiembre 22). Los stradomers elaborados de forma óptima de la presente invención también se pueden utilizar para tratar una enfermedad o afección que es

5 mediada por anticuerpos. Los autoanticuerpos median muchas enfermedades autoinmunes conocidas y probablemente juegan un papel en numerosas otras enfermedades autoinmunes. Las enfermedades mediadas por anticuerpos reconocidas en las cuales se pueden usar los stradomer elaborados de forma óptima de la presente invención incluyen, de modo no taxativo, nefritis

10 mediada por anticuerpos de membrana basal antiglomerular, inclusive la de Goodpasture; anticuerpos antidonante (aloanticuerpos específicos del donante) en trasplantes de órganos sólidos; anticuerpo antiacuaporina 4 en neuromielitis óptica; anticuerpo anti-VGKC en neuromiotonia, encefalitis límbica y síndrome de Morvan; receptor de acetilcolina antinicotínico y anticuerpos anti-MuSK en miastenia gravis; anticuerpos anti-VGCC en síndrome miasténico de Lambert Eaton; anticuerpos anti-AMPA y anti-GABA(B)R en encefalitis límbica asociada

15 frecuentemente con tumores; anticuerpos anti-GlyR en el síndrome de persona rígida o hiperecplexia; anticuerpos antifosfolípidos, anticardiolipina y anti- β_2 glicoproteína I en abortos espontáneos recurrentes, síndrome de Hughes y lupus eritematoso sistémico; anticuerpos de descarboxilasa de ácido antiglutámico en el síndrome de persona rígida, ataxia cerebelar autoinmune o encefalitis límbica; anticuerpos del receptor anti-NMDA en un síndrome

20 recientemente descrito, inclusive tanto elementos límbicos como subcorticales con trastornos destacados del movimiento, frecuentemente en adultos jóvenes y niños que se asocian frecuentemente con teratoma de ovario pero puede ser no paraneoplásico; anticuerpos anti-ADN de cadena doble, anti-ADN de cadena simple, anti-ARN, anti-SM y anti-C1q en lupus eritematoso sistémico; anticuerpos antinucleares y antinucleolares en enfermedades del tejido conjuntivo

25 inclusive escleroderma, síndrome de Sjogren y polimiositis inclusive anti-Ro, anti-La, anti-Scl 70, anti-Jo-1; anticuerpos del factor antirreumatoide en la artritis reumatoide; anticuerpos del antígeno de superficie anti-hepatitis B en poliarteritis nodosa; anticuerpos anticentrómero en el síndrome de CREST; anticuerpos antistreptococo en endocarditis o como riesgo de esta; antitroglbulina, antitiroide peroxidasa y anticuerpos del receptor anti-TSH en la tiroiditis de Hashimoto; anticuerpos

30 RNP anti-U1 en enfermedades del tejido conjuntivo mixto y lupus eritematoso sistémico; y antidesmogleína y anticuerpos antiqueratinocitos en pénfigo.

La composición de GL-2045 de la presente invención se pueden utilizar para tratar afecciones que incluyen, de modo no taxativo, insuficiencia cardíaca congestiva (CHF), vasculitis, rosácea, acné,

eccema, miocarditis y otras afecciones del miocardio, lupus eritematoso sistémico, diabetes, espondilopatías, fibroblastos sinoviales y estroma de médula ósea; pérdida ósea; enfermedad de Paget, osteoclastoma; mieloma múltiple; cáncer de mama; osteopenia por desuso; desnutrición, enfermedad periodontal, enfermedad de Gaucher, histiocitosis celular de Langerhans, lesión de la

5 médula espinal, artritis séptica aguda, osteomalacia, síndrome de Cushing, displasia fibrosa monoostótica, displasia fibrosa polioestótica, reconstrucción periodontal y fracturas óseas; sarcoidosis; cánceres óseos osteolíticos, cáncer de pulmón, cáncer de riñón y cáncer rectal; metástasis ósea, tratamiento del dolor de hueso, hipercalcemia maligna humoral, espondilitis anquilosante y otras espondiloartropatías; rechazo de trasplantes, infecciones virales, neoplasias

10 hematológicas y afecciones tipo neoplásicas, por ejemplo, linfoma de Hodgkin; linfomas no Hodgkin (linfoma de Burkitt, linfoma de linfocitos pequeños/leucemia linfocítica crónica, micosis fungoide, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma difuso de linfocitos B grandes, linfoma de la zona marginal, leucemia de células pilosas y leucemia linfoplasmacítica), tumores de células precursoras de linfocitos, incluido linfoma/leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B y

15 linfoma/leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T, timoma, tumores de linfocitos T y células NK maduras, inclusive leucemias de linfocitos T periféricas, leucemia de linfocitos T en adultos/linfomas de linfocitos T y leucemia linfocítica granular grande, histiocitosis de células de Langerhans, neoplasias mieloides como leucemias mielógenas agudas, incluida AML con maduración, AML sin diferenciación, leucemia promielocítica aguda, leucemia mielomonocítica

20 aguda y leucemias monocíticas agudas, síndromes mielodisplásicos y trastornos mieloproliferativos crónicos, inclusive leucemia mielógena crónica, tumores del sistema nervioso central, por ejemplo, tumores cerebrales (glioma, neuroblastoma, astrocitoma, meduloblastoma, ependimoma y retinoblastoma), tumores sólidos (cáncer nasofaríngeo, carcinoma de células basales, cáncer de páncreas, cáncer de la vía biliar, sarcoma de Kaposi, cáncer testicular,

25 cánceres uterino, vaginal o del cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado primario o cáncer de endometrio, tumores del sistema vascular (angiosarcoma y hemangiopericitoma)) u otro cáncer. La composición de GL-2045 de la presente invención se puede utilizar para tratar enfermedades autoinmunes. El término «enfermedad autoinmune», según se emplea en la presente, se refiere a un grupo variado de más de 80 enfermedades y afecciones. En todas estas enfermedades y

30 afecciones, el problema subyacente es que el sistema inmunológico del cuerpo ataca al propio cuerpo. Las enfermedades autoinmunes afectan a todos los sistemas principales del cuerpo incluido el tejido conectivo, los nervios, los músculos, el sistema endócrino, la piel, la sangre y los sistemas respiratorio y gastrointestinal. Las enfermedades autoinmunes incluyen, por ejemplo,

polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, neuropatía motora multifocal, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, miastenia grave y diabetes tipo 1.

La enfermedad o afección que se puede tratar con el uso de las composiciones y los métodos de la presente invención puede ser un proceso hematoinmunológico, que incluye, de modo no taxativo, anemia de células falciformes, púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia aloinmune/autoinmune, trombocitopenia inmune adquirida, neutropenia autoinmune, anemia hemolítica autoinmune, aplasia eritrocitaria asociada a parvovirus B19, autoinmunidad antifactor VIII adquirida, enfermedad de von Willebrand adquirida, mieloma múltiple y gammopatía monoclonal de significado incierto, sepsis, anemia aplásica, aplasia pura de glóbulos rojos, anemia de Diamond-Blackfan, enfermedad hemolítica del recién nacido, neutropenia mediada por el sistema inmunológico, refractariedad a la transfusión de plaquetas, púrpura postransfusión neonatal, síndrome urémico hemolítico, vasculitis sistémica, púrpura trombocitopénica trombótica o síndrome de Evans.

La enfermedad o afección también puede ser un proceso neuroinmunológico, inclusive, de modo no taxativo, síndrome de Guillain-Barré, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, polineuropatía desmielinizante de IgM paraproteinémica, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, miastenia gravis, neuropatía motora multifocal, síndrome de la neurona motora inferior asociado con anti-/GM1, desmielinización, esclerosis múltiple y neuritis óptica, síndrome de persona rígida, deterioro cerebeloso paraneoplásico con anticuerpos anti-Yo, encefalomielitis paraneoplásica, neuropatía sensorial con anticuerpos anti-Hu, epilepsia, encefalitis, mielitis, mielopatía especialmente asociada con virus 1 linfotrópico de linfocitos T humanos, neuropatía diabética autoinmune, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington o neuropatía disautonómica idiopática aguda.

La enfermedad o afección también puede ser inflamación o autoinmunidad asociada con pérdida de audición o pérdida de visión. Por ejemplo, la enfermedad o afección puede ser pérdida de audición relacionada con autoinmunidad como pérdida de audición inducida por ruido o pérdida de audición relacionada con la edad, o puede estar asociada con la implantación de dispositivos como dispositivos de audición (por ejemplo, implantes cocleares). En algunas modalidades, las composiciones proporcionadas en la presente se pueden administrar a un sujeto antes de, conjuntamente con, o posteriormente al implante de un dispositivo.

La enfermedad o afección también puede ser un proceso de enfermedad reumática, inclusive, de modo no taxativo, enfermedad de Kawasaki, artritis reumatoide, síndrome de Felty, vasculitis positiva para ANCA, polimiositis espontánea, dermatomiositis, síndrome antifosfolípido, abortos

espontáneos recurrentes, lupus eritematoso sistémico, artritis idiopática juvenil, enfermedad de Raynaud, síndrome de CREST o uveítis.

La enfermedad o afección también puede ser un proceso de enfermedad dermatoinmunológica, inclusive, de modo no taxativo, necrólisis epidérmica tóxica, gangrena, granuloma, enfermedades ampollas de la piel autoinmunes inclusive pénfigo vulgar, penfigoide bulloso y pénfigo foliáceo, vitiligo, síndrome de shock tóxico estreptocócico, esclerodermia, esclerosis sistémica inclusive esclerosis sistémica difusa y cutánea limitada o dermatitis atópica (especialmente dependientes de esteroides).

La enfermedad o afección también puede ser un proceso de enfermedad inmunológica musculoesquelética, inclusive, de modo no taxativo, miositis por cuerpos de inclusión, fascitis necrotizante, miopatías inflamatorias, miositis, miopatía anti-decorin (antígeno BJ), miopatía necrótica paraneoplásica, miopatía vacuolada vinculada a X, polimiositis inducida por penicilamina, aterosclerosis, enfermedad de la arteria coronaria o miocardiopatía.

La enfermedad o afección también puede ser un proceso de enfermedad inmunológica gastrointestinal, incluida, entre otras, anemia perniciosa, hepatitis activa crónica autoinmune, cirrosis biliar primaria, enfermedad celiaca, dermatitis herpetiforme, cirrosis criptogénica, artritis reactiva, enfermedad de Crohn, enfermedad de Whipple, colitis ulcerosa o colangitis esclerosante.

La enfermedad o afección también puede ser enfermedad de injerto contra hospedador, rechazo del injerto mediado por anticuerpos, rechazo de médula ósea después del trasplante, inflamación de la enfermedad posinfecciosa, linfoma, leucemia, neoplasia, asma, diabetes mellitus tipo 1 con anticuerpos de células anti-beta, síndrome de Sjogren, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, enfermedad de Addison, síndrome de Vogt-Koyanagi-Harada, glomerulonefritis membranoproliferativa, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, granulomatosis de Wegener, micropoliarteritis, síndrome de Churg-Strauss, poliarteritis nodosa e insuficiencia multisistema orgánica.

«Alergia», tal como se utiliza en la presente, incluye todas las reacciones inmunes mediadas por IgE así como aquellas reacciones que imitan las reacciones mediadas por IgE. Las alergias son inducidas por alérgenos, que incluyen proteínas, péptidos, carbohidratos, y combinaciones de estos, que desencadenan una respuesta inmune IgE o de tipo IgE. Las alergias de ejemplo incluyen alergias a las nueces, alergias al polen y alergias a las picaduras de insectos. Los alérgenos ilustrativos incluyen urushiol en roble y hiedra venenosa; antígeno de polvo del hogar; componentes del polen del abedul Bet v 1 y Bet v 2; el antígeno de 15 kD en el apio; antígeno de manzana Mal d 1; Pru p3 en durazno; alérgeno de polen de pasto Timothy Phl p 1; Lol p 3, Lol p I o

Lol p V en césped inglés; Cyn d 1 en grama común; alérgenos de ácaros del polvo, ácaros del polvo Der p1, Der p2, o Der f1; epítomos α -gliadina y γ -gliadina en gluten; fosfolipasa de veneno de abeja A2; epítomos Ara h 1, Ara h 2 y Ara h 3 en maníes.

En otra modalidad, la composición de GL-2045 descrita en la presente se pueden utilizar en un sistema de cebado donde se extrae sangre de un paciente y se pone en contacto transitoriamente con uno o más stradomers elaborados de forma óptima durante un período de tiempo de alrededor de media hora a alrededor de tres horas antes de ser introducida nuevamente en el paciente. En esta forma de terapia celular, las propias células efectoras del paciente se exponen al stradomer fabricado de forma óptima que está sujeto en una matriz *ex vivo* para modular las células efectoras a través de la exposición de las células efectoras al stradomer fabricado de forma óptima. La sangre, que incluye las células efectoras moduladas, se infunde nuevamente en el paciente. Dicho sistema de cebado puede tener numerosas aplicaciones clínicas y terapéuticas.

La composición de GL-2045 descrita en la presente también se puede aplicar fácilmente para modificar las respuestas del sistema inmune en diversos contextos para afectar los cambios específicos en los perfiles de respuesta inmune. La modificación o modulación de una respuesta inmune en un sujeto se refiere a aumentar, disminuir o cambiar la proporción o los componentes de una respuesta inmune. Por ejemplo, se puede aumentar o disminuir la producción de citocinas o los niveles de secreción según se desee al dirigirse al complemento junto con la combinación adecuada de FcR con un stradomer diseñado para unir el complemento e interactuar con esos receptores. La producción de anticuerpos también se puede aumentar o disminuir; la proporción de dos o más citocinas o receptores de células inmunes se puede cambiar; o se puede provocar la producción de tipos adicionales de citocinas o anticuerpos.

En una modalidad preferida, a un sujeto con una enfermedad autoinmune o inflamatoria se le modifica la respuesta inmune que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de GL-2045 descrita en la presente a un sujeto, donde la cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de GL-2045 modifica la respuesta inmune en el sujeto. Idealmente, esta intervención trata la enfermedad o la afección en el sujeto. La respuesta inmune alterada puede ser una respuesta aumentada o reducida y puede implicar niveles de citocina modificados inclusive los niveles de cualquiera de IL-1RA y otros miembros de la familia de IL-1, IL-6, IL-10, IL-8, IL-23, IL-7, IL-4, IL-12, IL-13, IL-17, receptores de IL-1, TNF- α , otros miembros de la familia TNF y receptores de TNF, IFN- α , otros miembros de la familia de interferones y receptores de interferones o niveles de quimiocina que incluyen los niveles de cualquiera de los miembros de la familia de quimiocina FAM19, CCL, CXC y XC. En una

modalidad preferida, IL-6 o IL-8 disminuyen en respuesta a la terapia. En una modalidad especialmente preferida, IL-6 e IL-8 disminuyen en respuesta a la terapia y/o IL-6 o IL-1RA aumentan en respuesta a la terapia. Sin embargo, la invención no se limita por ningún mecanismo de acción particular de los biomiméticos descritos. La respuesta inmune modificada puede ser un nivel de autoanticuerpos modificado en el sujeto. La respuesta inmune modificada puede ser un nivel de células T autoagresivas modificado en el sujeto.

Por ejemplo, la reducción de la cantidad de producción de TNF-alfa en las enfermedades autoinmunes puede tener efectos terapéuticos. Una aplicación práctica de esto es la terapia de anticuerpos anti-TNF-alfa (por ejemplo, REMICADE®) que se probó en forma clínica que trata la psoriasis en placas, artritis reumatoide, artritis psoriásica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y espondilitis anquilosante. Estas enfermedades autoinmunes tienen diferentes etiologías pero comparten componentes inmunológicos clave de los procesos de enfermedad relacionados con la inflamación y la actividad de las células inmunes. Un stradomer diseñado para reducir la producción de TNF-alfa será igualmente eficaz en estas y muchas otras enfermedades autoinmunes. El perfil de respuesta inmune modificado también puede ser la modulación directa o indirecta para efectuar una reducción en la producción de anticuerpos, por ejemplo autoanticuerpos dirigidos a los tejidos del propio sujeto o niveles de linfocitos T autoagresivos modificados en el sujeto. Por ejemplo, la esclerosis múltiple es un trastorno autoinmune que comprende linfocitos T autorreactivos que se pueden tratar mediante terapia con interferón beta. Véase, por ejemplo, Zafranskaya M, *et ál.*, Immunology mayo de 2007;121(1):29-39-Epub 18 de diciembre de 2006. Un stradomer fabricado de forma óptima diseñado para reducir los niveles de linfocitos T autorreactivos será igualmente eficaz en la esclerosis múltiple y en muchas otras enfermedades autoinmunes que comprenden los linfocitos T autorreactivos.

La composición de GL-2045 descrita en la presente se pueden utilizar para modular la expresión de las moléculas coestimuladoras de una célula inmune, que incluye una célula dendrítica, un macrófago, un osteoclasto, un monocito o una célula NK o para inhibir en estas mismas células inmunes la diferenciación, maduración o secreción de citocinas, que incluye la interleucina-12 (IL-12) o aumentar la secreción de citocinas, que incluye la interleucina-10 (IL-10), interleucina-6 (IL-6), o IL1-RA. Los expertos en la técnica también pueden validar la eficacia de un biomimético inmunológicamente activo optimizado mediante la exposición de una célula inmune al biomimético inmunológicamente activo optimizado y la medición de la modulación de la función de la célula inmune, donde la célula inmune es una célula dendrítica, un macrófago, un osteoclasto o un monocito. En una modalidad, la célula inmune se expone al biomimético inmunológicamente activo

optimizado *in vitro*, que además comprende la etapa de determinar la cantidad de un receptor de superficie de células o de una producción de citocinas, donde un cambio en la cantidad de receptor de superficie de células o en la producción de citocinas indica una modulación de la función de las células inmunes. En otra modalidad, la célula inmune se expone al biomimético inmunológicamente activo optimizado *in vivo* en un animal modelo para una enfermedad autoinmune que además comprende una etapa de evaluar un grado de mejora en la enfermedad autoinmune.

La composición de GL-2045 descrita en la presente también puede utilizarse como un componente de un dispositivo. En algunas modalidades, el GL-2045 proporcionado en la presente puede estar recubierto en un dispositivo, como un implante médico. Por ejemplo, los stradomers elaborados de forma óptima pueden estar recubiertos en un stent coronario o como parte de terapia de nanopartículas para aumentar la penetración y prolongar la liberación del fármaco, por ejemplo para el uso intraoftálmico en uveítis o degeneración macular. Los stradomers elaborados de forma óptima descritos en la presente también pueden utilizarse como un componente de un diagnóstico. En algunas modalidades, un experto en la técnica puede personalizar la terapia al determinar en qué pacientes el uso de un stradomer puede ser particularmente beneficioso. Por ejemplo, el experto en la técnica puede exponer las células inmunes de un paciente al biomimético inmunológicamente activo y medir la modulación de la activación o maduración de la célula inmune mediante citometría de flujo o perfil de citocina para identificar las que muestran una respuesta elevada.

Todas las referencias mencionadas en la presente se incorporan mediante esta referencia en su totalidad.

EJEMPLOS

Se tomaron varios enfoques en el proceso de fabricación para optimizar la combinación de alta titulación de proteína, viabilidad prolongada con pocos residuos celulares concomitantes y producción de multímeros de orden superior de GL-2045. Específicamente, los siguientes aspectos del proceso de fabricación corriente arriba se variaron para determinar las condiciones óptimas de los productos de GL-2045 con la propiedad de mayor multimerización: medio basal, tipo de suministro, tiempo del suministro, cambio de temperatura, aireación y condiciones del matraz de agitación. En cada caso, se analizaron la densidad celular, viabilidad celular, titulación de proteína y multimerización para identificar las condiciones óptimas. Además, los aspectos del proceso de fabricación corriente abajo, inclusive amortiguadores, protocolos de limpieza y selección de

columna, se variaron para determinar las condiciones óptimas para la purificación y filtración de GL-2045, donde se mantuvo el perfil de multimerización de GL-2045. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo ilustrativo y no limitativo.

5 **Ejemplo 1 - Fraccionamiento y análisis de interferometría de biocapa de GL-2045**

Las soluciones de GL-2045 se fraccionaron usando una columna GE Hi-Load 26/60 Superdex 200 pg (GE, n.º 17-1071-01) en Tris-HCL 0.05 M + amortiguador de NaCl 0.15 M (pH 7.5). Se cargaron 3.2 mL de solución de GL-2045 a una velocidad de flujo de 2.6 mL/min. Se recogieron seis fracciones (1-6) en volúmenes de 2.0 mL y se determinó la concentración de proteína por medición UV a 280 nm (Figura 1A). La multimerización de cada una de las fracciones de GL-2045 se evaluó. En resumen, las muestras de cada una de las fracciones 1-6 se cargaron en geles no reductores Nu-Page BT al 4-12 % (Invitrogen, n.º NP0322BOX). Se procesaron las muestras durante aproximadamente 3 horas a 150 voltios. Los resultados se proporcionan en la Figura 1B y demuestran diferencias marcadas en la presencia de multímeros de orden superior de GL-2045 entre las Fracciones 1-6. Las Fracciones 1-3 comprenden multímeros de orden inferior (por ejemplo, bandas 1-4). La Fracción 1 comprende casi exclusivamente el homodímero con un MW aparente de 55KD (Banda 1, estimaciones de MW de SDS-PAGE no reductor). La Fracción 2 comprende aproximadamente 97 % del dímero del homodímero que tiene un MW de 110 KD (Banda 2). La Fracción 3 comprende principalmente las Bandas 3 y 4 con MW de 165 KD y 220 KD, respectivamente, junto con cantidades más pequeñas de Bandas 2, 5 (MW = 275 KD), 6 (MW = 330 KD) y 7 (MW = 385 KD). La Fracción 4 comprende principalmente las bandas 4, 5 y 6, junto con cantidades más pequeñas de Bandas 3, 7, 8 (MW = 440 KD) y bandas de orden superior. Sin embargo, las Fracciones 5 y 6 comprenden principalmente multímeros de orden superior (bandas 5+).

Las fracciones de GL-2045 se analizaron para determinar la unión al receptor FcγRIIIA usando un análisis de unión de cinética de interferometría de biocapa. La interferometría de biocapa detecta la unión entre un ligando inmovilizado en la superficie de la punta del biosensor y un analito en solución. Cuando se da la unión, produce un aumento en el espesor óptico en la punta del biosensor, lo que produce un cambio en la longitud de onda (que se detecta como unidad de respuesta de «RU»). El nivel de unión máximo (RU máx.) es la cantidad máxima posible de unión de muestra en el equilibrio que satura la cantidad de ligando en la superficie del sensor.

Se unieron las proteínas del receptor etiquetadas con His (5 µg/mL) a una punta de sensor anti-His (Anti-Penta-His HIS1K, ForteBio n.º de cat. 18-5121) en amortiguador de análisis cinético 1X

de ForteBio (n.º de cat. 18-1092) durante 300 segundos. Se transfirió el sensor cargado al amortiguador cinético 1X sin receptores etiquetados o ligandos para obtener mediciones de referencia durante 60 segundos. Luego de obtener una referencia, se midió la constante de asociación del receptor/proteína mediante la transferencia de la punta del sensor a un amortiguador cinético 1x que contiene el stradomer purificado de elección durante 60 segundos a concentraciones de 50 µg/mL, 25 µg/mL y 12.5 µg/mL. La velocidad de disociación se midió durante 300 segundos al transferir la punta del sensor a un amortiguador cinético 1X, y el valor RU, velocidad de asociación, velocidad de disociación y valor K_d se calculó utilizando el software ForteBio.

Los resultados de la curva de unión se muestran en la Figura 2 y los datos de unión cinética calculados con software ForteBio Octet se proporcionan en la Tabla 2. Estas curvas de unión demuestran una mayor avidez con una velocidad de disociación cada vez menor para las fracciones que contienen GL-2045 de mayor peso molecular (por ejemplo, Fracciones 3, 4, 5 y 6) que la observada para fracciones de menor peso molecular (por ejemplo, Fracciones 1 y 2) e indican que las fracciones de alto peso molecular de GL-2045 se unen con más avidez que las fracciones con menor peso molecular.

Tabla 2: Resumen de datos de unión cinética para fracciones de GL-2045

Fracción	K_D	K_{on}	K_{dis}	R_{max}	R^2	χ^2
GL-2045	1.56E-11	4.73E+05	7.39E-06	0.830	0.999	0.0640
1	2.72E-07	1.00E+05	2.73E-02	0.507	0.986	0.0760
2	1.06E-08	3.34E+05	3.55E-03	0.673	0.995	0.0543
3	2.14E-10	5.94E+05	1.27E-04	0.786	0.997	0.1195
4	7.33E-12	5.99E+05	4.39E-06	0.852	0.991	0.2782
5	1.25E-12	1.18E+06	1.47E-06	0.853	0.993	0.1366
6	4.01E-11	1,08E+06	4.33E-05	0.930	0.994	0.0691

Ejemplo 2 - Ensayo de destrucción de células dependientes del complemento (CDC, por sus siglas en inglés) con fracciones de GL-2045

Se evaluó la capacidad de las fracciones de GL-2045 de inhibir la activación del complemento. GL-2045 se dividió por cromatografía de exclusión por tamaño en 6 fracciones (Figura 3A), cada una analizada para determinar la multimerización en un gel no reductor (Figura 3B). Para determinar los efectos de cada fracción en la activación del complemento, se incubaron células Will-2 que expresan CD20 con un anticuerpo monoclonal anti-CD20 durante 20 minutos, luego de lo cual se centrifugaron y volvieron a suspender en medio fresco. Luego se incubaron células en una placa de 96 pocillos en medio que contiene cada una las fracciones 1-6 descritas en la presente así como GL-2045 no fraccionado como una comparación a una de seis concentraciones; 100 µg/mL, 50 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL, 5 µg/mL o 1 µg/mL. Se agregó suero a las suspensiones celulares para iniciar la lisis celular dependiente del complemento y se incubó la placa a 37 °C durante 3 horas. Se cuantificó la muerte celular con el ensayo Promega Cytotox Glo. Se agregó el reactivo del ensayo Cytotox a cada pocillo de la placa y se incubó la placa en la oscuridad durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se leyó la luminiscencia luego de 15 minutos en un luminómetro Promega GloMax y se calculó la muerte celular a partir de esta lectura. Los resultados se muestran en las Figuras 4A-4D y demuestran que las fracciones 5 y 6 (que contienen los multímeros de mayor peso molecular en las bandas 5-13) mostraron una inhibición más profunda de CDC que los multímeros de menor peso molecular presentes en las fracciones 1-4. También cabe destacar que solo las fracciones que comprendían la banda 4 y más demostraron una inhibición eficaz de CDC, lo que es coherente con la unión de Fc polivalente de multímeros de orden superior a C1q hexamérico.

Ejemplo 3 – Unión de fracciones de GL-2045 a FcγRIIIa

Se determinó la unión de fracciones de GL-2045 a FcγRIIIa. El sobrenadante de GL-2045 se purificó por cromatografía de afinidad con proteína A HiTrap MabSelect Sure (GE n.º 11-0034-95) con un amortiguador de unión de 20 mM de fosfato de sodio, NaCl 0.15 M, pH 7.2 y se eluyó con glicina 0.1 M, pH 2.7 (Figura 5A). GL-2045 purificado por cromatografía de afinidad se almacenó en 1X PBS, pH 7.2 (Quality Biological, Inc n.º 119-069-101). Un grupo de GL-2045 purificado se dializó adicionalmente contra 50 mM de acetato de sodio, pH 5.0, y se purificó por cromatografía de intercambio catiónico en una columna CIEC (columna GOPURE 1.2 cm D x 10 cm L, Poros XS, Life Technologies, n.º 4448885) con un amortiguador de unión de 50 mM de acetato de sodio, pH 5.0 y un gradiente de elución (0 a 100 % de amortiguador de elución) con 50 mM de acetato de

sodio, NaCl 1 M, pH 5.0. La etapa de pulido se realizó sin la eliminación de los multímeros de orden máximo y/o agregados sin orden de las fracciones finales. Como etapa final, el GL-2045 pulido por CIEX se concentró a un volumen de ≤ 5 mL y se intercambi6 el amortiguador contra el amortiguador de procesamiento de filtraci6n de gel y se inyect6 en una columna de filtraci6n de gel (Hiload 26/60 Superdex 200pg (GE n.° 17-1071-01)) usando Tris-HCl 0.05 M + NaCl 0.15 M, pH 7.5 como amortiguador de procesamiento (Tris HCL, pH 7.5 Teknova n.°T1075). Luego las fracciones se analizaron para determinar la multimerizaci6n por an6lisis de gel (Figura 5B y Figura 5C).

La uni6n de GL-2045 fraccionado a FcγRIIIa se determin6 usando un ensayo de uni6n ELISA a FcγRIIIa. Brevemente, se recubrieron 96 placas con FcγRIIIa recombinante y se dejaron reaccionar con GL-2045. Luego de lavar, la cantidad de material unido a FcγRIIIa se determin6 usando un mAb de detecci6n de Fc en un ensayo basado en ELISA (Figura 6A y Figura 6B). Los valores EC_{50} de cada fracci6n se muestran en la Tabla 3. Estos resultados demuestran que los multímeros de orden superior (Fracciones 1C4, 1C5, 1C6, 1C7, 1C8, 1C9, 1C10 y 1C11) demuestran una uni6n con mayor avidez, observada por una EC_{50} baja, a FcγRIIIa que los multímeros de orden inferior (Fracciones 1D9, 1E4 y 1F7) y, sorprendentemente, uni6n con m6s avidez que los multímeros de m6ximo peso molecular (Fracciones 1C3, 1C2, 1C1, 1B12, 1B11). Se presume que las fracciones de m6ximo peso molecular comprenden algunas fracciones de agregados de alto peso molecular y menor potencia junto con los multímeros de orden m6ximo altamente funcionales (por ejemplo, Fracciones 1B11, 1B12, 1C1, 1C2 y 1C3). Estos resultados indican muy sorprendentemente que no todas las fracciones de alto peso molecular de GL-2045 demostraron mayor uni6n a FcγR, lo que probablemente se debe a los efectos de la agregaci6n sin orden del homodímero en oposici6n a la formaci6n de multímeros de alto peso molecular y de orden superior. Estos datos indican la necesidad de métodos de fabricaci6n corriente abajo optimizados (inclusive condiciones optimizadas para la purificaci6n de proteína A, cromatografía de intercambio i6nico y cromatografía de interacci6n hidrof6bica) en combinaci6n con los métodos de fabricaci6n corriente arriba 6ptimos para resultar en la producci6n y retenci6n de multímeros de alto peso molecular y mayor orden y la eliminaci6n de agregados de alto peso molecular y sin orden (por ejemplo, 1B11 y 1B12), que son menos eficaces al unirse a receptores objetivo de baja afinidad (véase los valores de EC_{50} 1B11 y 1B12 en la Tabla 3).

Tabla 3: Valores de EC₅₀ para la unión de las fracciones de GL-2045 a FcγRIIIa

Fracción	AC/CIEX EC50 ng/mL
1B9	NT
1B10	NT
1B11	27.2
1B12	10.8
1C1	4.96
1C2	7.09
1C3	3.68
1C4	1.92
1C5	2.33
1C6	1.59
1C7	1.56
1C8	1.01
1C9	2.52
1C10	0.870
1C11	1.60
1D4	2.26
1D5	NT
1D9	3.15
1E4	3.82
1E8	NT
1F7	15.7
1F8	NT

NT = no analizado

Ejemplo 4 – Análisis quimiotáctico inducido pro C5a de fracciones de GL-2045

El cultivo de células de GL-2045 se cultivó en medio PowerCHO2 (Lonza, n.º U21-070) con L-Glutamina (Lonza, n.º 17-605E) y complemento HT (Life Technologies, n.º 11067-030). El sobrenadante de GL-2045 se purificó por cromatografía de afinidad con proteína A HiTrap MabSelect Sure (GE, n.º 11-0034-95) luego se dividió en fracciones con AIEX HiScreen Q FF (GE, n.º 28-9505-10) usando diferentes condiciones de pH para separar las bandas de bajo peso molecular con las bandas de alto peso molecular. Los resultados se muestran en la Figura 7 (GL-GLM-01= recombinante, Fc no fraccionado (G001), GL-GLM-02 = GL-2045 no fraccionado, GL-GLM-05 = GL-2045 fraccionado a pH 6.0, GL-GLM-06 = GL-2045 fraccionado a pH 6.5, GL-GLM-07 = GL-2045 fraccionado a pH 7.0, GL-GLM-08 = GL-2045 fraccionado a pH 7.5). Por último, las diferentes fracciones se concentraron y dializaron contra HBSS (Lonza, n.º 10-527F).

El sobrenadante de GL-2045 se purificó por cromatografía de afinidad con proteína A (pA) HiTrap MabSelect Sure (GE, n.º 11-0034-95) con un amortiguador de unión de 20 mM de fosfato de sodio, NaCl 0.15 M, pH 7.2. Después de un primer lavado con el amortiguador de unión y un segundo lavado con un amortiguador que comprende NaCl 1 M, 5 mM de EDTA, Urea 2 M, 50 mM de fosfato pH 7.0, la proteína unida a pA se eluyó con glicina 0.1 M, pH 2.7.

GL-2045 purificado por cromatografía de afinidad se almacenó en 1X PBS, pH 7.0 (Quality Biological, Inc n.º 119-069-101). 4 lotes de GL-2045 purificado se diluyeron adicionalmente (6X) con 50 mM de Tris-HCL a pH 6.0, 6.5, 7.0 o 7.5 y se purificaron por cromatografía de intercambio aniónico en una columna HiScreen Q FF con un amortiguador de unión de 50 mM de Tris-HCL pH 6.0, 6.5, 7.0 o 7.5 y se eluyeron por elución de gradiente (0 a 100% de amortiguador de elución) con 50 mM de Tris-HCL + NaCl 1 M a pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5.

Estas fracciones purificadas se utilizaron para determinar los efectos de las fracciones de GL-2045 en la quimiotaxis de neutrófilos. Brevemente, se agregó complemento C5a como quimioatrayente al pocillo inferior de una cámara Boyden a una concentración de 1 nM. Antes de la adición a la cámara Boyden, los neutrófilos (concentración final 2.25×10^6 células/mL, purificados a partir de sangre entera de PBMC) se preincubaron con las fracciones de GL-2045 indicadas (0.02-10 µg/mL concentraciones finales µg/mL) o Fc recombinante de control (GLM-001, G001) durante 30 minutos. Luego se agregaron suspensiones celulares al pocillo superior de la cámara Boyden y se incubaron durante 25 minutos. Después del período de incubación, las poblaciones migradas se evaluaron contando la cantidad de células en la cámara inferior para cada condición y se determinó el porcentaje de quimiotaxis para cada condición (Figura 8). No se observó quimiotaxis para GL-GLM-001 (Fc recombinante de control, G001). Los multímeros de orden superior

(fracciones GL-GLM-002, GL-GLM-005, GL-GLM-006 y GL-GLM-007 que comprenden bandas 5 – 13) demostraron una inhibición más ávida de quimiotaxis inducida por C5a que los multímeros de orden inferior (Fracción GL-GLM-008 que comprende las bandas 1 – 4).

Los datos provistos en los Ejemplos 1-4 demostraron la eficacia potenciada de multímeros de orden superior sobre GL-2045. En función de los datos que anteceden, se evaluaron los protocolos de fabricación corriente arriba para determinar las condiciones óptimas para la producción específica de multímeros de orden superior (por ejemplo, bandas 5+ en las Figuras 1, 3, 5 y 7) de GL-2045 para lograr una eficacia biológica máxima.

Ejemplo 5 – Tamizaje de medio base en la producción de GL-2045

El objetivo de este experimento era evaluar el efecto de un panel de medios basales en la titulación de proteína GL-2045, viabilidad celular, densidad celular y multimerización de GL-2045.

GL-2045 se cultivó en medio ProCHO5 (Lonza n.º 12-766Q) con L-Glutamina (Lonza n.º 17-605E) e hipoxantina de sodio y timidina (HT, Gibco n.º 11067-030) en una incubadora con agitación a 37 °C y 5% de CO₂. Luego del pasaje, las células se lavaron e inocularon por duplicado a 0.5 x10⁶ células/mL en medio seleccionado (mostrado en la Tabla 4) en un tubo de centrifuga de 50 mL. Cada tubo contenía 10 mL de cultivo y se colocó en una incubadora de agitador Kuhner marca maglev a 37 °C, 5% de CO₂, 80 % de humedad y una velocidad de rotación de 180 rpm. Los días 4, 8 y 10, se tomó una muestra de un mililitro de cada cultivo para medir la densidad celular, viabilidad celular y nivel de glucosa. Las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se almacenaron a +4 °C. Los medios seleccionados que no contenían 4 mM de L-glutamina y 1X hipoxantina de sodio y timidina se complementaron con L-Glutamina y HT como componentes. Las condiciones de crecimiento de los medios seleccionados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: Condiciones de crecimiento de medios seleccionados

Medio	Fabricante	L- Glutamina	HT	% C02	% de humedad
CD FortiCHO	LifeTechnologies	4mM	1X	5	80
TC-42 (CHOMACS CD)	TeutoCell (Xell)	4mM	1X	5	80
Hyclone CDM4CHO	Thermo Scientific	4mM	-	5	80
Hyclone ADCF MAB	Thermo Scientific	4mM	-	5	80
PowerCHO3 CD	Lonza	4mM	1X	5	80
Ex-Cell CHO5	Sigma-Aldrich	4mM	-	5	80
BalanCD CHO Growth A	Irvine	4mM	1X	5	80
EX-CELL CD CHO	Sigma Aldrich	4mM	-	5	80
CHO-S-SFM II	LifeTechnologies	4mM	-	5	80
ExpiCHO Expression	LifeTechnologies	-	1X	5	80
GE Healthcare SFM4CHO	GE Healthcare	4mM	1X	5	80
ClonaCell-CHO CD	Stemcell Tech.	4mM	1X	5	80
GE Healthcare HYQ SFX- CHO LM	GE Healthcare	4mM	1X	5	80
Cell Vento CHO 210	Millipore	4mM	1X	5	80
ActiCHO P	GE	4mM	-	5	80
Cell Vento CHO 110	Millipore	4mM	1X		80
CD Hybridoma	Thermo Scientific	4mM	-	5	80
CD OptiCHO	Thermo Scientific	4mM	1X	5	80
PowerCHO-GS	Sartorius AG	4mM	-		80

Los cultivos celulares de GL-2045 cultivados en medio seleccionado se evaluaron para determinar la densidad celular, viabilidad celular, titulación de proteína y porcentaje de multímeros de orden superior. Las evaluaciones de densidad celular y viabilidad celular se realizaron mezclando las células con Trypan azul. Se contaron las células viables y muertas utilizando un contador celular manual. Los datos para el Día 4 y Día 8 de cultivo se muestran para la densidad celular (Figura 9, Tabla 5) y viabilidad celular (Figura 10, Tabla 6). De los 19 medios evaluados, la máxima densidad celular el día 4 se observó con ActiCHO P, CHOMACS CD y CD FortiCHO. Al día 8, la tendencia en la densidad celular fue negativa para todos los medios excepto para ActiCHO P, BalanCD CHO,

ExpiCHO, Cell Vento CHO 210 y Cell Vento CHO 110, en comparación con el día 4. De los 19 medios, la máxima viabilidad celular el día 8 evaluada se observó con ActiCHO P seguido de ExpiCHO, Cell Vento CHO 110 y HYQ SFX-CHO LM. El único medio de los 19 medios evaluados con una tendencia positiva en la viabilidad celular desde el Día 4 al Día 8 fue ActiCHO P. Por lo tanto, el único medio que produce alta densidad celular al Día 4 y no tiene una tendencia negativa para la densidad celular al Día 8 es ActiCHO P.

Tabla 5: Densidad de células CHO que producen GL-2045

Medio	Día 4 (10 ⁶ /mL)	Día 8 (10 ⁶ /mL)
CD FortiCHO	9.75	0.00
TC-42 (CHOMACS CD)	10.35	0.00
Hyclone CDM4CHO	4.70	0.00
Hyclone ADCF MAB	2.00	1.81
PowerCHO3 CD	3.72	1.34
Ex-Cell CHO5	4.20	1.20
ActiCHO P	11.40	23.30
BalanCD CHO Growth A	7.80	13.46
EX-CELL CD CHO	4.80	1.24
CHO-S-SFM II	7.10	0.00
ExpiCHO Expression	7.40	19.40
SFM4CHO	7.30	6.80
ClonaCell-CHO CD	6.10	3.80
HYQ SFX-CHO LM	1.70	2.80
Cell Vento CHO 210	6.90	16.50
Cell Vento CHO 110	7.70	17.40
CD Hybridoma	5.35	5.00
CD OptiCHO	6.45	4.70
PowerCHO-GS	2.80	1.25

Tabla 6: Viabilidad de células CHO que producen GL-2045

Medio	Día 4 (% Viable)	Día 8 (% Viable)
CD FortiCHO	99.5	0.0
TC-42 (CHOMACS CD)	99.4	0.0
Hyclone CDM4CHO	89.5	0.0
Hyclone ADCF MAB	98.5	78.6
PowerCHO3 CD	82.7	29.1
Ex-Cell CHO5	85.0	56.9
ActiCHO P	92.4	100.0
BalanCD CHO Growth A	98.5	91.0
EX-CELL CD CHO	92.2	27.3
CHO-S-SFM II	98.9	0.0
ExpiCHO Expression	99.5	98.8
SFM4CHO	99.7	80.0
ClonaCell-CHO CD	96.0	62.9
HYQ SFX-CHO LM	100.0	95.2
Cell Vento CHO 210	98.6	90.7
Cell Vento CHO 110	99.4	98.3
CD Hybridoma	99.1	82.6
CD OptiCHO	99.2	83.2
PowerCHO-GS	98.2	86.2

Los cultivos se centrifugaron el día 10, se filtraron a 0.2 μ m y se mantuvieron a 4 °C hasta la purificación usando una columna de afinidad de proteína A. Para la purificación, los cultivos de sobrenadante se purificaron por cromatografía de afinidad con 1 mL de columna de proteína A HiTrap MabSelect SuRe (GE, n.º 11-0034-93) con un amortiguador de unión de 20 mM de fosfato de sodio, NaCl 0.15 M, pH 7.2. La proteína unida a la columna se lavó con el amortiguador de

unión seguido de un segundo lavado con NaCl 1 M, 5 mM de EDTA, urea 2 M, 50 mM de fosfato, pH 7.0. GL-2045 unido a la columna se eluyó con glicina 0.1 M pH 2.7 y se desaló en 1X PBS a pH 7.0 mediante una columna de desalado HiPrep 26/10 (GE, n.º 17-5087-01). Todas las muestras purificadas se almacenaron a 4 °C. Las mediciones de la titulación de proteína se realizaron con interferometría de biocapa (Octet) (Figura 11 y Tabla 7). De los 19 medios base evaluados, la mayor titulación de proteína al día 10 se observó con Cell Vento CHO 110 seguido de medio BalanCD CHO Growth A, ActiCHO P y ExpiCHO. Una caída considerable de la titulación se produjo con otros medios.

Tabla 7: Titulación de GL-2045

Medio	Proteína (mg/L)
Cell Vento CHO 110	577.9
BalanCD CHO Growth A	542.0
ActiCHO P	514.4
ExpiCHO Expression	513.0
Cell Vento CHO 210	359.1
CD FortiCHO	323.7
CHO-S-SFM II	296.2
CD OptiCHO	295.8
SFM4CHO	295.8
PowerCHO-GS	269.9
TC-42 (CHOMACS CD)	232.4
CD Hybridoma	226.7
EX-CELL CD CHO	194.4
HYQ SFX-CHO LM	179.2
Ex-Cell CHO5	179.2
ClonaCell-CHO CD	170.9
Hyclone CDM4CHO	111.6
PowerCHO3 CD	105.5
Hyclone ADCF MAB	89.4

Para determinar el porcentaje de multímeros de orden superior, cada cultivo purificado se procesó (en forma no reducida) en un gel SDS-PAGE (NuPage 3-8 % de gel Tris-Acetato, Life Technologies, n.º EA03752BOX). Se diluyeron 2 µg de proteína en 3 µL de amortiguador de muestra (NuPage, LDS (4X), Life Technologies, n.º NP0007), 20 µM de yodoacetamida (Bio Rad n.º 163-2109) y agua desionizada (DI) hasta un volumen final de 10 µL. Las muestras se calentaron a 80 °C durante 10 minutos y se cargaron en el gel y se procesaron a 150V durante 1 hora y 25 minutos usando amortiguador de procesamiento (Tris-Acetato SDS (20X) (Life Technologies, n.º LA0041)). Los geles se lavaron en agua DI, se tiñeron con SimplyBlue Safe (Life Technologies, n.º LC6060) y se destiñeron en agua DI. Luego de un desteñido completo, se tomó una fotografía usando un sistema G:BOX de Syngene y se analizó el patrón de formación de bandas por densitomería con software GeneTools, Syngene. Se midió la intensidad en cada banda individual en cada carril (Figura 12A y Figura 12B).

Inesperadamente, el mayor porcentaje de multímeros de orden superior por encima de la banda 4 de los 19 medios evaluados se observó con ActiCHO P seguido de EX-CELL CD CHO y CH- S SFM2 (Tabla 8). Estos datos indican que el aumento del porcentaje de multímeros de orden superior es una variable independiente que se debe controlar y no se correlaciona simplemente con un aumento en la titulación de proteína total. ActiCHO P resultó en la tercera titulación de proteína más alta y el máximo nivel de multimerización (45.9 % de la proteína presente en las bandas 5+), mientras que Cell Vento CHO 110 resultó en la máxima titulación de proteína pero un nivel sustancialmente menor de multimerización (32.6% de proteína presente en las bandas 5+).

Tabla 8: Análisis de multimerización de GL-2045

Medio	% Bandas (1-4)	% Bandas (5+)
ActiCHO P	54.1	45.9
EX-CELL CD CHO	59.4	40.6
CHO- SSFM2	61.2	38.8
TC-42	64.0	36.0
SFM4CHO	64.1	35.9
Power CHO3 CD	65.3	34.7
Hyclone ADCF	66.1	33.9
Cell Vento 210	66.5	33.5
Cell Vento 110	67.4	32.6
CD OptiCHO	67.6	32.4
ExpiCHO	68.1	31.9
CD Hybridoma	68.6	31.4
Power CHO GS	68.7	31.3
Balance CD CHO	70.0	30.0
CDM4 CHO	70.2	29.8
Clonal Cell CHO	70.4	29.6
CD FortiCHO	70.4	29.6
HYQ SFX CHO	70.8	29.2
EX-CELL CHO 5	71.4	28.6

Ejemplo 6 – Tamizaje de medios de GL-2045 con suministros***Cronogramas de suministro recomendados***

En función de los resultados de los experimentos en el Ejemplo 5, cuatro medios base asociados con las máximas titulaciones de proteína de GL-2045 y tres medios base asociados con las mínimas titulaciones de proteína de GL-2045 se sometieron a un experimento repetido donde se proporcionaron suministros comercialmente disponibles durante el cultivo. Cell Vento 110 y ExpiCHO, que produjeron altas titulaciones, no se seleccionaron para el experimento de suministro debido a que no se identificaron suministros recomendados por el fabricante. Cell Vento CHO 110 es un medio completo que se usará para la adaptación de células sin suministros, mientras que

Cell Vento 210 se usa para el cultivo en combinación con suministros. Las combinaciones de medios y suministro usadas en este experimento se detallan en la Tabla 9.

Tabla 9: Combinaciones de medio + suministro

Medio	Suministro
Cell Vento CHO-210 EMD Millipore n.° 1025531000	Cell Vento Feed-210 + cisteína / Tirosina + Glucosa EMD Millipore n.° 1.02488
BalanCD CHO Growth A Medium A IRVINE n.° 91118	BalanCD CHO Feed 1 IRVINE n.° 91127
CD FortiCHO Life Technologies n.° A11483-01	CD EfficientFeed C AGT complemento nutricional Life Tech. n.° A13275-04
CDM4CHO Hyclone n.° SH30558.01	Cell Boost 4 (PS307) Hyclone SH30857
PowerCHO3 CD Lonza n.° 12-772Q	Power Feed A + L-Glutamina n.° BE02-044Q
ADCF-Mab Hyclone n.° SH30349.02	Cell Boost 4 (PS307) Hyclone n.° SH30857
Medio ActiCHO P PAA n.° U21-070	Feed A, Feed B PAA n.° U15-072, PAA n.° U05-034*

*PAA después se volvió parte de GE Lifesciences

El clon 58 de GL-2045 se cultivó en medio «ProCHO5» (Lonza n.° 12-766Q) con L-Glutamina (Lonza n.° 17-605E) e hipoxantina de sodio y timidina (HT, Gibco n.° 11067-030) en una incubadora con agitación a 37 °C y 5% de CO₂. Luego del pasaje, las células se lavaron e inocularon a 0.5 x10⁶ células/ml, luego se subcultivaron cuando las densidades alcanzaron 1 ×10⁶ a 3×10⁶ células/mL and ≥ 80 % de viabilidad. El clon 58 de GL-2045 se adaptó directamente en medio seleccionado detallado en la Tabla 10. La adaptación se consideró completa cuando las células lograban un tiempo de duplicación estable (20 – 30 horas) y una densidad celular viable ((VCD) ≥ 90 % durante al menos 2 – 3 pasajes. Las células se sembraron a 0.5 x 10⁶ células/mL en un medio seleccionado (d0) y se incubaron en una plataforma de agitación estándar en una

incubadora fijada a 150 rpm a 37 °C, 5% de CO₂ y alta humedad. Para todos los cultivos excepto PowerCHO3 CD, el suministro comenzó el Día 3 (d3). El suministro con medio PowerCHO3 CD comenzó en d1. El volumen de cultivo total fue de 120 mL. Los cultivos se cosecharon cuando la viabilidad caía al 50 %. La línea de células estable de GL-2045 se cultivó en cada uno de 7 medios junto con el suministro recomendado por el fabricante de acuerdo con el protocolo recomendado. La estrategia y cronograma de suministro para cada uno de los medios evaluados se describe en la Figura 13A y Figura 13B.

A lo largo del estudio se realizaron mediciones de densidad celular, viabilidad celular y titulación de proteína de GL-2045. Para la titulación de proteína, las muestras se centrifugaron hasta células de sedimento y la medición de la proteína en el sobrenadante celular se realizó por interferometría de biocapa (Octet) del sobrenadante celular como se describen en el Ejemplo 6. La multimerización de GL-2045 se evaluó al final de cada grupo del estudio luego de la purificación de proteína A como se describen en el Ejemplo 5. Los cultivos se continuaron hasta el día 14 o hasta que la viabilidad caía por debajo del 50 %.

Sorprendentemente, GL-2045 cultivado en ActiCHO P con suministros recomendados por el fabricante logró un pico mucho mayor de densidad celular que GL-2045 cultivado en cualquiera de los otros medios con suministros recomendados por el fabricante. Esta densidad celular fue sorprendentemente 3 veces superior o más en comparación con todas las otras combinaciones de medio / suministro evaluadas excepto por Cell Vento 210 (Figura 14).

Además, GL-2045 cultivado en ActiCHO P, CD FortiCHO, o ADCF MAB con suministros recomendados por el fabricante logró una viabilidad celular mucho mejor (2-3 veces) el día 10 que GL-2045 cultivado en los otros medios evaluados con suministros recomendados por el fabricante. Esto demuestra que estos tres medios resultan en una viabilidad celular superior en comparación con varias otras combinaciones de medio / suministro evaluadas (Figura 15).

Además, la línea de células CHO de GL-2045 estable cultivada en medio ActiCHO P con ActiCHO Feed A y ActiCHO Feed B recomendados por el fabricante generó titulaciones sustancialmente mayores que cualquier otro medio y suministro recomendado por el fabricante evaluado (Figura 16). La titulación producida a partir del cultivo con ActiCHO P fue al menos 4 veces mayor que la de cualquiera de los otros medios evaluados, alcanzando 2 g/L el día 10 en un matraz de agitación en comparación con menos de 500 mg/L de Cell Vento CHO-210- el día 12 e incluso menos para otros medios.

La multimerización de GL-2045 como se mide por porcentaje de multímero en bandas 5 y más (5+) de las diferentes condiciones de cultivo se determinó como se describe en el Ejemplo 5 (Figura 17,

Tabla 10). La máxima velocidad de multimerización de GL-2045 usando medio base y suministros recomendados por el fabricante fue CD FortiCHO seguido de ActiCHO y PowerCHO3. ADCF-Mab y BalanCD demostraron una multimerización de GL-2045 considerablemente peor en comparación con otras condiciones de cultivo.

Tabla 10: Porcentaje de multímero con combinaciones de medio + suministro

Medio + suministro	% Bandas 1-4	% Bandas 5+
(1) ADCF-Mab + Cell Boost 4 Feed	76.2%	23.8%
(2) PowerCHO3 CD + PowerFeed A	70.3%	29.7%
(3) CDM4CHO + Cell Boost 4 Feed	74.8%	25.2%
(4) CD FortiCHO + CD Efficient Feed C	64.3%	35.7%
(5) BalanCD CHO Crecimiento A + BalanCD CHO Feed1	76.1%	23.9%
(6) Cell Vento CHO-210 + Cell Vento Feed-210	72.2%	27.8%
(7) ActiCHO P + Feed A, Feed B	69.9%	30.1%

En resumen, el medio ActiCHO P es considerablemente mejor que los otros medios evaluados respecto de densidad celular, viabilidad celular y titulación de proteína. El análisis de densitometría indica que el medio CD FortiCHO + CD Efficient Feed C tiene el máximo porcentaje de multímeros más activos (Tabla 10, banda 5+) a 35.7 %. Sin embargo, el medio CD FortiCHO + CD Efficient Feed C tuvo el máximo porcentaje de material de alto peso molecular que no se mueve al gel a 4.7 % (como se observó en la parte superior del gel en la Figura 17), lo que sugiere que este medio también genera una mayor fracción de multímeros agregados y sin orden con menos multímeros de orden superior y más funcionales que ActiCHO P. ActiCHO P más feed A y B tiene el segundo porcentaje más alto de bandas de multímero de orden superior por encima de la banda 4 a 30.1 % con una cantidad insignificante de material de alto peso molecular agregado no específicamente que no se mueve al gel. Por lo tanto, ActiCHO P probablemente tiene el máximo porcentaje de bandas de multímero de orden superior completamente funcional. Estos datos indican además, sorprendentemente, que las condiciones de fabricación corriente arriba no solo afectan la

viabilidad celular, densidad celular y titulación de proteína total sino también la producción de multímeros de GL-2045 de orden superior eficaces desde el punto de vista clínico. Como se demuestra en el Ejemplo 3, las fracciones de máximo peso molecular presentaron una menor unión a FcR γ IIIa, lo que sugiere que las fracciones de máximo peso molecular (por ejemplo, agregados de GL-2045 sin orden) son menos biológicamente activas que el multímero de orden superior de GL-2045. Como se muestra en la presente, muy sorprendentemente, de todos los medios basales evaluados, solo ActiCHO-P demostró una titulación de proteína de GL-2045 total alta, alta multimerización, así como cantidades mínimas de agregados de GL-2045 de alto peso molecular y sin orden.

Protocolos de suministro alterados

Luego de determinar que el medio ActiCHO P + suministro resultó en una titulación de proteína óptima y producción de multímeros de orden superior, se evaluaron cronogramas de suministro alterados para determinar si se podrían lograr resultados similares u optimizados mediante un suministro día por medio. Tal como se demuestra en la FIGURA 18, el suministro día por medio (azul) no afectó notoriamente la densidad celular (Figura 18A), viabilidad celular (Figura 18B), pH de cultivo (Figura 18C) o titulación de proteína (Figura 18D) en comparación con un suministro diario. Estos resultados indican sorprendentemente que se pueden obtener resultados similares con suministro día por medio y puede preferirse para mantener la esterilidad y minimizar los costos de fabricación. Sin embargo, experimentos similares con suministro cada tres días sugirieron que la viabilidad y producción de proteínas puede comenzar a reducirse al suministrar con una frecuencia menor a cada 2 días (Figura 19).

Se realizaron experimentos adicionales para determinar si se podían usar los suministros ActiCHO P Feeds con otros medios basales diferente a ActiCHO para lograr resultados similares. Brevemente, el clon 58 de GL-2045 se cultivó en Power CHO-2 CD (Lonza, n.º 12-771Q) + 4mM L-Glutamina (Lonza, n.º 17-605E) + 1X HT complemento (Gibco, n.º 11067-030). Luego del pasaje, las células se lavaron e inocularon a 0.3×10^6 células/ml en medio completo ActiCHO P + 6 mM de L-Glutamina (Lonza, n.º 17-605E) o medio completo Power CHO-2 CD y se cultivaron sin cambio de temperatura. A los cultivos de ActiCHO P PowerCHO se les suministró cada día + 1 mL de ActiCHO Feed-A (PAA, n.º U15-072) + 0.1 mL de Feed-B (PAA, n.º U05-034). El día 9, se determinó la viabilidad celular y titulación de proteína como se describen en el Ejemplo 5 en todo el cultivo (Figura 20). Los resultados muestran que, cuando se usa con ActiCHO Feeds A y B de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, tanto PowerCHO2 como ActiCHO P generan la

misma viabilidad celular y rendimiento de proteína de GL-2045. Por lo tanto, si la composición de multímero permanece sin cambios respecto de ActiCHO P + A + B, ActiCHO Feeds A y B pueden usarse con otros medios base de alto rendimiento seleccionados.

5 **Ejemplo 7 – Tiempo óptimo y alcance del cambio de temperatura para la producción de GL-2045**

El objetivo de este experimento era evaluar el tiempo óptimo y alcance del cambio de temperatura. Varios investigadores han considerado los efectos del cambio de temperatura en el ciclo celular, apoptosis y metabolismo de una línea de células de ovario de hámster chino (CHO) recombinante.

10 Sin embargo, si bien generalmente se toma en cuenta el efecto del cambio de temperatura en la densidad celular viable, se ha prestado poco o nada de atención a la densidad celular mínima necesaria para los resultados de los cambios de temperatura óptimos. Además, la densidad celular mínima necesaria para llevar a cabo de manera exitosa un cambio de temperatura en stradomers multimerizantes no se ha considerado.

15 Los investigadores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que para la expresión óptima de GL-2045 y titulación máxima, se requiere una densidad celular viable mínima de 10 millones de células/mL al momento del cambio de temperatura. Además, este requisito es más importante que el día de cultivo en el que se produce el cambio de temperatura. El tiempo del cambio de temperatura es sorprendentemente más exitoso cuando la densidad celular viable se encuentra en una fase de crecimiento logarítmico, generalmente cuando la densidad celular viable es 10 - 15 millones de células/mL. Esto generalmente corresponde al día 4 – 5 del cultivo de biorreactor dependiendo de la densidad de siembra inicial.

20 Además, alejándose de lo que se describe en la técnica, un cambio de temperatura de 37 grados centígrados (37° C) +/- 1.0 C a 32.5C +/- 1.0 C se prefiere a un cambio de temperatura a 31° C +/- 0.5 C para las condiciones corriente arriba óptimas para fabricar altas titulaciones de GL-2045. Se generaron dos grupos separados de sobrenadante de GL-2045 a partir de clones de CHO estables usando condiciones idénticas excepto por la naturaleza del cambio de temperatura. Las células CHO se cultivaron en un biorreactor de único uso 10L XDR-10 Biorreactor System (Xcellerex, GE) con un cambio de pH de 7.1 a 7.0 el día 5. Se usaron 7 litros de ActiCHO-P CD (n.º de catálogo U21-051) para la producción junto con 280 ml diarios de PAA Feed A (n.º de catálogo U15-053) y 28 ml diarios de PAA Feed B (n.º de catálogo U15-054). PAA Feed A y B son equivalentes a ActiCHO Feed A y Feed B. El cambio de temperatura a 32.5 grados (A) y el cambio de

temperatura a 31.0 grados (B) se produjeron cada uno el día 5. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11: Efectos del cambio de temperatura en la viabilidad de células CHO y rendimiento de GL-2045

Grupo	Rendimiento purificado con pA	Viabilidad del día 21	Viabilidad del día 22	Densidad celular pico
A	7.2 g/L	90.2%	88.8%	25.0 x 10 ⁶ células/mL (día 9)
B	5.1 g/L	86.1%	83.8%	19.3 x 10 ⁶ células/mL (día 9)

Ejemplo 8 – La purificación de columna de proteína A de GL-2045 requiere procedimientos de CIP más frecuentes

GL-2045 se purificó por cromatografía de afinidad (AC) con una columna de proteína A HiTrap MabSelect SuRe (GEn.° 11-0034-95) con un amortiguador de unión de 20 mM de fosfato de sodio, NaCl 0.15 M, pH 7.2 y se eluyó con glicina 0.1 M, pH 2.7. GL-2045 purificado por AC se almacenó en 1X PBS, pH 7.0 (Quality Biological, Inc n.° 119-069-101). Las purificaciones de GL-2045 por AC se procesaron sin procedimientos de limpieza en sitio (CIP) de columna al final de cada procesamiento. Los procedimientos de CIP típicamente implican hacer fluir hidróxido de sodio diluido (NaOH 0.1 – 0.5 M) a través de la columna entre ciclos de purificación para hidrolizar los depósitos mientras se desinfecta la resina de proteína A, regenerando de ese modo la capacidad de unión de la columna de proteína A (Boulet-Audet *et ál*, Scientific Reports, Vol. 6, 2016). GL-2045 se purificó en 4 columnas de afinidad de proteína A separadas (columnas 1-4, procesamiento 11.27.12). Las mismas columnas de afinidad de proteína A se usaron luego para un segundo procesamiento de purificación de afinidad (procesamiento 11.28.12) después de eluir la columna con un amortiguador de elución al 100 %. La purificación de GL2045 dos veces usando la misma columna mostró una cantidad reducida de la especie de menor peso molecular, tanto el homodímero como el dímero del homodímero, después de un segundo procesamiento de purificación (Figura 22). Como se muestra en la Tabla 12, el análisis de densitometría de SDS-PAGE demostró una pérdida significativa de bandas de homodímero y dímero, lo que indica que las bandas de menor peso molecular son superadas en la unión a las columnas de afinidad de proteína A por proteína GL-2045 residual, con alta avidez a la proteína A, que no se retira completamente de la columna de proteína A por elución con amortiguador de elución.

Tabla 12: Densitometría de GL-2045 purificado con proteína A

Banda de homodímero 1	Procesamiento 11.27.12	Procesamiento 11.28.12	% de diferencia de procesamiento 1/2
Columna 1	14.1	8.8	-37.6
Columna 2	16.5	16.8	1.8
Columna 3	21.8	18.5	-15.1
Columna 4	22.2	21.3	-4.1
		Promedio	-13.8
Dímero Banda 2	Procesamiento 11.27.12	Procesamiento 11.28.12	Porcentaje de diferencia de procesamiento ½
Columna 1	24.9	19.8	-20.4
Columna 2	17.5	15.3	-12.6
Columna 3	17.1	14.5	-15.2
Columna 4	15.5	11.7	-24.5
		Promedio	-18.2

La pérdida de bandas de menor peso molecular indica que hay una unión basada en avidez a la columna de afinidad por lo cual GL-2045 multimérico de alto peso molecular con múltiples sitios de unión a la proteína A supera las especies de bajo peso molecular, provocando una pérdida de las especies de menor peso molecular y cambiando de manera eficaz la composición del fármaco. Estos datos sugieren que los procedimientos de CIP más frecuentes, y por lo tanto la regeneración más frecuente de la columna de proteína A, son necesarios para la purificación óptima de GL-2045 cuando se usan columnas de proteína A para múltiples procesamiento de purificación. Estos resultados fueron inesperados debido a que, como se describe anteriormente, la regeneración típicamente requiere el uso de NaOH que degradaría las columnas de proteína A más comúnmente usadas en la técnica. El uso más frecuente de tal amortiguador resultaría entonces en una degradación más rápida de la columna de proteína A. De este modo, debe usarse una columna de proteína A capaz de resistir procedimientos de CIP frecuentes con un amortiguador de NaOH de alta resistencia, como NaOH 0.5 M, para la regeneración de columnas de proteína A

usadas repetidas veces en la purificación de GL-2045 para mantener el perfil óptimo del fármaco de GL-2045 intacto.

Ejemplo 9 - Los procedimientos de CIP para regenerar la proteína A para varios ciclos de purificación de GL-2045 requieren NaOH 0.5 M

La pérdida de especies de bajo peso molecular en ausencia de procedimientos de CIP, como se muestra en el Ejemplo 8, también indica que hay especies de alto peso molecular que permanecen unidas a la columna de afinidad de proteína A después del primer procesamiento de columna, ocupando de este modo los sitios de unión y evitando la unión de especies de menor peso molecular en posteriores procesamientos de purificación. Estos datos indican que se deberían usar procedimientos de CIP adicionales para mantener el perfil de multímero de GL-2045 purificado por proteína A.

Los inventores de la presente invención descubrieron que mediante la purificación regular y diaria usando la columna HiTrap MabSelect (GE n.º 28-4082-58), después de aproximadamente 6 – 7 procesamientos de purificación, la composición del GL-2045 purificado cambiaba, marcado por una pérdida sutil de las fracciones de homodímero y dímero. Un experto en la técnica que purifique, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal no esperaría encontrar un cambio en la composición del producto purificado después de 6 – 7 procesamientos de purificación de proteína A. Para solucionar este problema, se realizaron los procedimientos de CIP con NaOH 0.1 M recomendado por el fabricante para regenerar la capacidad de unión de la columna de proteína A. Estos procedimientos de CIP se realizaron después de cada procesamiento de purificación, que es más frecuente de lo usando en la técnica. Al emplear procedimientos de CIP frecuentes se produjo algo de mejora pero no se resolvió el problema de una pérdida de las especies de menor peso molecular. Por lo tanto, los inventores dedujeron que la unión ávida de GL-2045 a la proteína A requiere un régimen de CIP más riguroso de lo que usaría un experto en la técnica normalmente para regenerar completamente la columna para facilitar la retención del homodímero y dímero.

Sin embargo, las resinas habitualmente usadas en las columnas de proteína A (por ejemplo, MabSelect) no son resistentes a NaOH y por lo tanto se degradarían rápidamente con el uso de un amortiguador de NaOH más riguroso y esta degeneración está asociada con una menor capacidad de purificación y con un cambio en la composición del multímero de GL-2045. Sin embargo, un medio de proteína A utilizado menos habitualmente (por ejemplo, MabSelect SuRe (General Electric n.º 11-0034-95)), puede resistir una limpieza potenciada con NaOH 0.5. De este modo, los inventores usaron una columna MabSelect SuRe con procedimientos diarios de CIP usando un

amortiguador de NaOH 0.5 M. Luego de la implementación de procedimientos de CIP más frecuentes y más rigurosos, la purificación con proteína A de GL-2045 se logró diariamente sin pérdida de homodímero o dímero y sin cambio en la composición de GL-2045.

Por lo tanto, los inventores descubrieron que la CIP de la columna de proteína A de GL-2045 requiere procedimientos de CIP más rigurosos y más frecuentes de los que utilizaría habitualmente un experto en la técnica que trabaja con un anticuerpo monoclonal o una proteínas de fusión Fc para retener el homodímero y dímero y, por lo tanto, el perfil óptimo, del fármaco de GL-2045 intacto.

Ejemplo 10 - Los gradientes de elución de pH de la columna de proteína A se usan para purificar GL-2045 de agregados de homodímero que no son multímeros de orden superior

Los gradientes de elución de pH se usan habitualmente con columnas de proteína A durante la purificación de proteínas para optimizar el rendimiento de proteína total pero no se usan típicamente para cambiar la composición de un fármaco. Los inventores de la presente han descubierto que tal gradiente de elución de pH en una columna de proteína A puede usarse para eliminar los agregados sin orden de GL-2045 de los multímeros de orden superior. El sobrenadante de CHO de GL-2045 se purificó por cromatografía de afinidad (AC) con proteína A HiTrap MabSelect Sure (GEn.° 11-0034-95) con un amortiguador de unión de 20 mM de fosfato de sodio, NaCl 0.15 M, pH 7.2 y seguido de un lavado adicional con el amortiguador de unión. GL-2045 unido a la proteína A se eluyó con un amortiguador de elución que comprende 0 % a 100 % de glicina 0.1 M, pH 2.7, creando de este modo un gradiente de pH para la elución de GL-2045 de la columna de afinidad de proteína A. Las fracciones de eluato se recogieron en una placa de 96 pocillos (Greiner bio-one n.° 780271) y se neutralizaron a pH 7.5 agregando Tris-HCl pH 9.0 en cada pocillo. Las cantidades de proteína equivalentes de cada una de las fracciones se procesaron luego en un gel SDS-PAGE no reductor (4-12 % de NuPage Bis-Tris, Invitrogen n.° NPO322BOX). En análisis SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por elución de la columna de proteína A con un gradiente de elución de pH demostró que las especies de muy alto peso molecular se eluían por último en la fracción D6 y D7 (Figura 23A y Figura 23B). Sorprendentemente, la primera fracción (D1) también contenía especies de alto peso molecular. De este modo, estos resultados indican que las fracciones de alto peso molecular pueden separarse de las especies principales (por ejemplo, homodímeros, dímeros y multímeros de orden superior) de GL-2045 por elución de gradiente de pH de columna de afinidad de proteína A. Como se muestra en los Ejemplos 1-3,

estas fracciones pueden representar especies de menor actividad demostrado por una menor unión al receptor de Fc y menor inhibición de CDC.

También se muestra en el gel (Figura 23B, carril de más a la derecha) una fracción de muy alto peso molecular obtenida por regeneración (CIP por NaOH 0.5 M y neutralizada por HCl). Estos resultados indican que hay especies de alto peso molecular que residen en la columna de proteína A después de la elución, lo que nuevamente indica una necesidad de un amortiguador de NaOH muy riguroso durante los procedimientos de CIP para regenerar la capacidad de unión de columna completa.

Por lo tanto, aunque habitualmente no se usaría con este fin, los gradientes de elución de pH se pueden usar para retirar y separar los agregados sin orden y de alto peso molecular de GL-2045 de los multímeros de orden superior e inferior y biológicamente activos. Esta separación puede emplearse para optimizar o mantener adicionalmente el perfil de multímero de GL-2045 purificado. De manera alternativa, un gradiente de elución por etapas puede usarse para llegar a una composición de GL-2045 optimizado.

Ejemplo 11 – Las condiciones de sal y pH de columna de intercambio iónico modifican la composición del multímero de GL-2045

Un objetivo importante de la purificación de GL-2045 es el control estrecho de la composición de multímero del producto final purificado. Las columnas de intercambio iónico (por ejemplo, intercambio catiónico y aniónico) se usan de manera rutinaria para las etapas de pulido de purificación de anticuerpos monoclonales y proteínas de fusión Fc. Los inventores de la presente invención evaluaron el medio de intercambio catiónico, POROS CIEX (Invitrogen GoPure XS (10 mL) n.º de catálogo 4448885) con amortiguadores de elución que comprenden diferentes concentraciones de sal. GL-2045 se purificó primero por cromatografía de afinidad de proteína A y luego se agrupó y dializó en 50 mM de acetato de sodio, pH 5.0 antes de cargarse en la columna CIEX. Se usaron 50 mM de acetato de sodio, pH 5, como amortiguador de equilibrio y lavado. Los efectos del contenido de sal del amortiguador de elución (EB) en el pulido de GL-2045 se evaluaron con un amortiguador de elución de 50 mM de acetato de sodio agregando cantidades variables de amortiguador B (NaCl 1M, pH 5, mostrado como % en la Figura 24). Se realizaron corridas de cromatografía en AktaAvant. Brevemente, el método Avant comprende equilibrar la columna CIEX con 50 mM de acetato de sodio, pH 5, a 2 mL/min a un volumen total de 10 volúmenes de columna (cv). Se cargaron 65 a 100 mg de GL-2045 que se habían dializado previamente en 50 mM de acetato de sodio, pH 5 en la columna. La columna se lavó con 5 cv de

amortiguador de unión a 2 mL/min. Luego se eluyó GL-2045 con entre 9 y 15 cv de amortiguadores que comprenden porcentajes variables de NaCl (por ejemplo, amortiguadores de elución que comprenden 30-50 % del amortiguador B) a 2 mL/min.

El % de recuperación de GL-2045 se determinó para GL-2045 eluido con amortiguadores de elución que comprenden 30 % de amortiguador b, 40 % de amortiguador b y 50 % de amortiguador b ((30 % de EB, 40 % de EB y 50 % de EB, respectivamente) para determinar el intervalo óptimo de concentraciones de sal para los amortiguadores de elución (Figura 24). Estos datos demostraron que las alteraciones del contenido de sal en el amortiguador de elución pueden modificar sustancialmente la composición de multímero de GL-2045.

Tabla 13: % de recuperación de GL-2045 eluido con amortiguadores de elución que comprenden 30-50 % de amortiguador b

Paso de elución	% de amortiguador B	Fracción	% de carga
1	30	5A1-5A3	37.9
2	40	5B1-5B3	53.8
3	50	6A1-6A3	3.2
4	100	1A1-1B5	0.6
Residuos			4.2

Como se muestra en el Ejemplo 11 y se cuantifica en la Tabla 13, el análisis SDS-PAGE demostró diferencias drásticas en la separación de las especies de peso molecular de GL-2045 al eluirse con 30 % de EB, 40 % de EB o 50 % de EB. 91.7 % del material se eluyó con un amortiguador de elución que comprende 30-40 % de amortiguador b y el material recuperado con un amortiguador de elución que comprende 50 % de amortiguador B solo fue material de alto peso molecular. Estos datos demostraron que las alteraciones del amortiguador de elución pueden modificar sustancialmente la composición de multímero de GL-2045. Por lo tanto, está claro que el amortiguador de elución seleccionado para el intercambio iónico puede usarse para modificar la composición de multímero de GL-2045, un uso novedoso de esta tecnología. Al mismo tiempo, los inventores descubrieron que, si no se desea cambio alguno en la composición de GL-2045 en la etapa de pulido de intercambio iónico, se requiere un nivel de precisión que habitualmente no usa

el experto en la técnica para seleccionar la concentración de sal del amortiguador de elución para usarse en las etapas de pulido de intercambio iónico.

Ejemplo 12 - La cromatografía de intercambio iónico se puede usar para reducir o eliminar el homodímero o dímero del homodímero

Debido a que 91.7 % del material de GL-2045 en el Ejemplo 11 se eluyó con amortiguadores de elución que comprenden entre 30-40 % de amortiguador b y el material recuperado con amortiguadores de elución que comprende 50 % de amortiguador B solo fue el material de alto peso molecular, los amortiguadores de elución con un intervalo de amortiguador b de 30-40 % se seleccionaron para un análisis más profundo. Los métodos utilizados fueron similares a los descritos en el Ejemplo 11.

El análisis SDS-PAGE demostró diferencias drásticas en la separación del homodímero de GL-2045 cuando se eluye con amortiguadores de elución que comprenden 35 %, 36 % o 37 % o más de amortiguador b (35 % de EB, 36 % de EB, 37 % de EB, etc., respectivamente). Cabe destacar que el homodímero y dímero del homodímero que son claramente visibles a 35 % de EB, por el contrario, se reducen en gran medida a 36 % de EB y se eliminan completamente a 37 % de EB y más (Figura 25). De manera similar, el análisis SDS-PAGE demuestra diferencias drásticas en la separación de los multímeros de orden máximo de GL-2045 y agregados sin orden grandes cuando se eluyen a 35 % de EB, 36 % de EB o 37 % de EB o cuando se eluyen con amortiguadores de elución con mayores concentraciones de amortiguador b. Por lo tanto, está claro que el amortiguador de elución seleccionado para el intercambio iónico puede usarse para modificar el perfil de multímero de GL-2045, un uso novedoso de esta tecnología. También es evidente que los datos de esta elución por etapas pueden usarse por un experto en la técnica para seleccionar elución de única etapa o múltiples etapas para obtener el perfil de GL-2045 deseado. Por ejemplo, el pulido de GL-2045 usando una columna POROS C1EX y un amortiguador de elución que comprende 36.5-38.5 % de amortiguador b retendrá todos los homodímeros, dímeros y multímeros hasta el multímero 10 y eluirá los agregados sin orden grandes y los multímeros de orden máximo. Un ejemplo similar que usa una columna diferente se muestra en el Ejemplo 4.

Ejemplo 13 - La cromatografía de intercambio iónico se puede usar para reducir o eliminar agregados de homodímero grandes y los multímeros de orden máximo

La fabricación de composiciones óptimas de GL-2045 requiere minimizar la cantidad de multímero de GL-2045 de orden máximo (por ejemplo, bandas por encima de la banda 10 claramente

delimitable, aproximadamente 600kD) y eliminar material por encima de 1000 kD para retirar tanto los agregados de homodímero grandes como los multímeros de orden máximo cuyo aumento de valencia otorga un mayor riesgo teórico de inmunogenicidad. GL-2045 se eluyó con amortiguadores de elución que comprenden diferentes porcentajes de amortiguador b (38 % de EB (C1), 39 % de EB (C2) y 40 % de EB (C3)) (Figura 26). Los picos de elución principales de GL-2045 se observaron a 38 % (C1), 39 % (C2) y 40 % (C3) (Figura 26), seguido de picos de menor elución a 50 % y 100 % de amortiguador B. El % de recuperación de GL-2045 para cada amortiguador de elución se determinó y se representa en la Tabla 14.

Tabla 14: Porcentaje de rendimiento de GL-2045 con amortiguadores de elución variados

Rendimiento de C1		
Paso de elución	% de amortiguador B	% de rendimiento
1	38	85.1
2	50	10.7
3	100	0.6
Residuos		3.5
Rendimiento de C2		
Paso de elución	% de amortiguador B	% de rendimiento
1	39	93.4
2	50	2.96
3	100	0.2
Residuos		3.6
Rendimiento de C3		
Paso de elución	% de amortiguador B	% de rendimiento
1	40	93.8
2	50	1.97
3	100	0.6
Residuos		3.5

Los perfiles de multímero de las fracciones de GL-2045 eluidas se determinaron por inspección visual de análisis SDS-PAGE (Figura 27). La inspección visual del análisis SDS-PAGE de fracciones eluidas indicó que 38 % del amortiguador de elución recuperó GL-2045 con la mínima cantidad de material de alto peso molecular residual.

- 5 Los picos de GL-2045 se cuantificaron por densitometría (Figura 28, resumidos en la Tabla 15 como porcentaje de intensidad en bandas de SDS-PAGE). El pico 11 representa el homodímero con el menor peso molecular y el pico 1 representa el material con el máximo peso molecular que preferentemente se elimina.

Tabla 15: Resumen de análisis densitométrico

Pico	AC/CIEX 38% (C1)	AC/CIEX 39% (C2)	AC/CIEX 40% (C3)	AC (control)
1	2.87	2.64	2.7	4.93
2	1.73	0.83	0.62	0.8
3	1.55	1.11	0.58	1.09
4	3.34	3.43	3.39	3.29
5	5.08	4.9	5.34	5.16
6	10.04	9.55	10.05	9.86
7	11.27	11.1	11.55	10.13
8	20.22	19.52	20.89	17.35
9	10.12	12.1	11.6	9.2
10	11.47	12.4	11.43	9.29
11	13.68	16.36	14.75	14.67

Estos resultados demuestran que un protocolo de elución por etapas con un amortiguador de elución de acetato que comprende 38 % o 39 % de amortiguador B a pH 5 proporcionó aproximadamente 85 % de las fracciones preferidas de GL-2045 y redujo las fracciones de mayor peso molecular por encima de 600 kD. Pese a que la inspección visual de SDS-PAGE indicó que el material de alto peso molecular era menor en la fracción eluida con un amortiguador de elución que comprende 38 % de amortiguador b, el análisis densitométrico indicó que el menor porcentaje de la fracción de máximo peso molecular se obtuvo con un amortiguador de elución que

comprende 39 % de amortiguador b. Sin embargo, el análisis densitométrico demostró que todas las composiciones de proteína purificada por CIEX contenían cantidades más pequeñas en una fracción de alto peso molecular (banda 1), en comparación con el material purificado por cromatografía de afinidad solo. En resumen, el análisis del eluato sugiere que la cantidad de agregados grandes y los multímeros de orden máximo puede controlarse aplicando condiciones de elución controladas con la columna Poros CIEX. Por lo tanto, está claro que el amortiguador de elución seleccionado para el intercambio iónico puede usarse para modificar la composición de multímero de GL-2045 de orden superior más grande y de agregados grandes, un uso novedoso de esta tecnología. Un ejemplo similar que usa una columna diferente se muestra en el Ejemplo 4.

Ejemplo 14 - Modificación de la composición de multímero de GL-2045 con columnas de cromatografía de interacción hidrofóbica

GL-2045 se produjo a partir de una línea celular de HEK 293F estable y se cultivó en medio 293 Freestyle (Gibco n.º 12338-018) con Glutamax (Gibco n.º 35050-061) y Geneticina (Gibco n.º 10131-027). Los sobrenadantes se cultivaron dos veces por semana y se filtraron a 0.2 µm en un sistema de filtro de 1 L, (Corning n.º 431098). Luego el sobrenadante de GL-2045 se purificó con proteína A HiTrap MabSelect SuRe (GEn.º 11-0034-95) con un amortiguador de unión de 20 mM de fosfato de sodio, NaCl 0.15 M, pH 7.2 y se eluyó con amortiguador de elución de citrato de sodio 0.1 M con un pH de 3.0 – 3.6. GL-2045 purificado por AC se almacenó en 1X PBS, pH 7.0 (Quality Biological, Inc n.º 119-069-101).

Luego GL-2045 se purificó en 7 columnas de interacción hidrofóbica (HIC) diferentes usando el kit de selección de HIC HiTrap HIC Selection Kit (GE n.º 28-4110-07). Las columnas incluidas en este kit se describen en la Tabla 16.

Tabla 16: Columnas de interacción hidrofóbica

	Columnas	CV
1	HiTrap Octilo FF	1 mL
2	HiTrap Butilo HP	1 mL
3	HiTrap Fenilo FF (sust. baja)	1 mL
4	HiTrap Butilo FF	1 mL
5	HiTrap Butilo-S FF	1 mL
6	HiTrap Fenilo FF (sust. alta)	1 mL
7	Hi Trap Fenilo FF	1 mL

Las columnas de HIC se equilibraron con 50 mM de fosfato de sodio, sulfato de amonio 1.0 M, pH 7.0 (amortiguador de partida) y 3.5 mg de GL-2045 purificado por AC (diluido en 4 volúmenes de amortiguador de partida) se cargaron en cada columna. Después de lavar con el amortiguador de partida, se realizó un gradiente de elución usando 0 % a 100 % de 50 mM de fosfato de sodio, pH 7.0. Todos los picos fraccionados y de paso de flujo se evaluaron por SDS page. Las muestras no reducidas se cargaron en Tris HCl 15 % (Bio-Radn.° 161-115). La tinción se realizó usando un kit de tinción plata de Invitrogen n.° LC6100.

Las siete columnas de HIC diferentes demostraron diferentes perfiles de multímero de GL-2045. A modo de ejemplo, la columna de butilo HP separó la fracción de homodímero (fracción A10) de la especie de peso molecular multimérico encontrada en A12. El mismo efecto se vio con la columna de fenilo HP (fracción B11 en comparación con la fracción B8). Solo 16 % del material cargado se recuperó en las fracciones de elución con la columna de Octilo FF, lo que indica que puede ser adecuado para un método de pulido de modo de paso de flujo de GL-2045. Además, las fracciones eluidas de la columna de Octilo FF contenían las especies de mayor peso molecular, lo que indica que la columna también puede ser adecuada para retirar especies de agregados de homodímero con muy alto peso molecular que tienen menor potencia.

Un experimento similar se llevó a cabo en la versión murina de GL-2045, conocida como M045, M045 se purificó por cromatografía de afinidad de proteína A y luego se purificó en AKTA Avant (GE) por HIC con Hiload 26/10 Phenyl Sepharose High Performance (GE 17-1086-01). La columna de HIC se equilibró con fosfato de sodio 0.1 M, sulfato de amonio 1 M, pH 7.0 (amortiguador de partida) y M045 se cargó en la columna seguido de una etapa de lavado con el amortiguador de partida para retirar todos los materiales no unidos. Luego se eluyó M045 con fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.0 de amortiguador de elución con un gradiente de elución (Figura 30-31).

Las fracciones purificadas por HIC de M045 se analizaron por SDS-PAGE para determinar el efecto del pulido de columna de HIC en el perfil de multímero de M045. Estos resultados demuestran además que las columnas de interacción hidrofóbica pueden usarse para modificar la composición de multímero de M045, lo que se ve por la clara separación de las fracciones de homodímero, dímero, trímero y multímero (Figura 32).

Ejemplo 15 - Ejemplo de protocolo de GL-2045 producido de forma óptima

Los datos descritos en la presente demuestran las condiciones óptimas para varias variables del proceso de fabricación corriente arriba y corriente abajo para GL-2045 que resultan en la optimización de (1) titulación de proteína, (2) viabilidad celular en el cultivo y (3) multimerización de

GL-2045 y (4) mantenimiento del perfil de multímero en la sustancia de fármaco de GL-2045 final. Cabe destacar que el nivel de multimerización de GL-2045 es crítico para la eficacia clínica del stradomer (véase Ejemplos 1-4). Los métodos de cultivo actuales no se dirigen necesariamente a la producción optimizada de una fracción específica o la mejora de un patrón de multimerización particular. De este modo, las condiciones y reactivos de cultivo corriente arriba y las condiciones y medios de purificación corriente abajo que afectan la multimerización son desconocidos y no se pueden predecir en función del estado de la técnica actual.

Los datos descritos en la presente resultaron en el descubrimiento de los siguientes elementos de protocolo para generar GL-2045 fabricado de forma óptima:

(1) El medio base óptimo para generar GL-2045 fabricado de forma óptima es ActiCHO P.

Los datos descritos en la presente demuestran que el medio base óptimo era ActiCHO P. Las células CHO cultivadas en un biorreactor en medio base ActiCHO P resultaron en una alta densidad celular y viabilidad celular, a la vez que optimizaban un aumento en la titulación de proteína en comparación con los otros medios evaluados. Sorprendentemente, el medio ActiCHO P resultó en un aumento en el porcentaje de multímeros de orden superior de GL-2045 presentes al final del protocolo de cultivo.

(2) Los suministros óptimos para generar GL-2045 fabricado de forma óptima son ActiCHO P, ActiCHO Feed A y Feed B.

Los datos descritos en la presente demuestran además que el suministro óptimo era ActiCHO P Feed A y Feed B, agregado al cultivo cada día o cada dos días. ActiCHO P Feed A y Feed B mantuvieron alta densidad celular y alta viabilidad celular, a la vez que resultaban en una titulación de proteína que era 4 veces mayor que las otras combinaciones de medio/suministro evaluadas. De manera importante e inesperada, el medio ActiCHO P con Feed A y Feed B resultó en un alto nivel de multímeros de orden superior y, más importante aún, una reducción en el porcentaje de agregados sin orden y de alto peso molecular de GL-2045 en comparación con las otras combinaciones de medio/suministro evaluadas. Estos datos indican que esta combinación de medio/suministro particular resulta en la producción de un mayor porcentaje de multímeros de GL-2045 con mejor eficacia clínica (por ejemplo, mayor porcentaje de multímeros de GL-2045 de orden superior). Los inventores de la presente invención descubrieron sorprendentemente resultados similares para la adición de Feed A y Feed B día por medio, lo que indica que esta combinación de medio/suministro particular puede usarse para reducir los costos y mitigar el riesgo de contaminación asociado con la manipulación diaria del cultivo.

Además, el medio ActiCHO P con Feed A y Feed B resultó en la producción de un porcentaje sustancial de GL-2045 que existe como multímeros de orden superior, a la vez que se minimiza el porcentaje de agregados sin orden y de alto peso molecular de GL-2045. De este modo, esta combinación particular de medio/suministro sorprendentemente optimizó de manera específica las fracciones biológicamente funcionales y clínicamente eficaces de GL-2045 multimerizado de orden superior, optimizando de este modo la retención del perfil de multímero de GL-2045 a la vez que se reduce la necesidad de eliminar los agregados de orden superior en otras etapas de purificación corriente abajo.

(3) El cambio de temperatura óptimo para generar GL-2045 fabricado de forma óptima es un cambio de 37 °C a 32.5 °C en función de la densidad celular.

Los datos descritos en la presente demuestran además que un cambio de temperatura de 37 °C a 32.5 °C en función de la densidad celular resulta en una óptima densidad celular, viabilidad celular y titulación de proteína. Este protocolo de cambio de temperatura es una desviación de los protocolos establecidos (Ouguchi *et ál*, Cytotechnology, 52(3), pp. 199-207, (2006); Masterson y Smales, Pharmaceutical Bioprocessing, 2(1), pp. 49-61, (2014)), que describen un cambio de temperatura de 37 °C a 31 °C basado simplemente en el día de cultivo. Los inventores de la presente invención descubrieron inesperadamente que el cambio de la temperatura a 32.5 °C después de que las células habían alcanzado una densidad de $\sim 10\text{-}15 \times 10^6$ células/mL resultó no solo en el mantenimiento de una alta densidad celular y viabilidad celular sino también en un aumento considerable en la titulación de proteína en comparación con los protocolos establecidos anteriormente.

Los datos demostrados en la presente indican que los protocolos de purificación corriente abajo específicos resultan en composiciones de GL-2045 con un perfil de multimerización optimizado. Al llevar a cabo estos métodos de purificación, se debe poner mucha atención a mantener el perfil de multímero deseado de GL-2045 mediante el control de las condiciones de columna y amortiguadores. Esto contrasta completamente con un anticuerpo monoclonal, proteína de fusión Fc, o proteína derivada de CHO similar donde la pureza y la retención de rendimiento son los objetivos principales.

(4) La purificación de proteína A optimizada de GL-2045 requiere métodos de CIP frecuentes y rigurosos.

GL-2045 se une con avidez a la proteína A. Esta unión ávida resultó en que GL-2045 permaneciera unido al medio de la proteína A en la columna cuando se usaban procedimientos de CIP habitualmente utilizados para la purificación de mAb. Como resultado, con ciclos repetidos de

uso de la columna de proteína A, las fracciones de homodímero de GL-2045 no pudieron unirse a la proteína A y fluyeron a través de la columna. Esto resultó en un cambio sustancial y funcionalmente importante en el perfil de multímero del producto de GL-2045 purificado por proteína A final. Por lo tanto, la unión ávida de GL-2045 resultó en un requisito de procedimientos de CIP más frecuentes y más rigurosos (por ejemplo, que usan un amortiguador de lavado de NaOH 0.5 M) de los que se usan comúnmente en la técnica (por ejemplo, durante la purificación de proteínas de fusión Fc o mAb). Estos resultados fueron inesperados, ya que las columnas de proteína A más comúnmente usadas no son capaces de resistir los lavados de NaOH rigurosos necesarios para retirar los multímeros de GL-2045 y para regenerar completamente la columna de proteína A. Por lo tanto, solo algunas columnas de proteína A, especialmente MabSelect SuRe, pueden usarse para la purificación de GL-2045 y requerirán procedimientos de CIP frecuentes con aproximadamente NaOH 0.5 M para mantener el perfil de multímero de GL-2045 deseado.

(5) Un gradiente de elución de pH o elución por etapas facilita la separación de las fracciones de máximo peso molecular de GL-2045 de los multímeros de orden superior e inferior.

Usar el gradiente de elución de pH con purificación de proteína A resultó en que los componentes de máximo peso molecular se eluyeran en las primeras y últimas fracciones de elución. Estos datos indican que un gradiente de pH se puede utilizar para separar las fracciones biológicamente activas de GL-2045 (por ejemplo, el homodímero, dímero y multímeros de orden superior) de las fracciones que comprenden los agregados de alto peso molecular sin orden, que se había demostrado anteriormente que tenían menor actividad biológica.

(6) El amortiguador de elución óptimo para el pulido de GL-2045 por cromatografía de intercambio iónico es un amortiguador de acetato + 30-40 % de amortiguador b, especialmente 37.5 %-39 % +/- 0.5 %.

La cromatografía de intercambio iónico se usa comúnmente para pulir el fármaco de impurezas durante la producción de mAb. Sin embargo, los inventores de la presente invención utilizaron cromatografía de intercambio iónico para eliminar las fracciones específicas de GL-2045 (por ejemplo, los multímeros de orden máximo y agregados sin orden y de alto peso molecular del homodímero) de manera tal que se lograra un perfil de multimerización óptimo. En particular, los inventores de la presente invención descubrieron que un amortiguador de elución de 30-40 % de amortiguador b reducía la cantidad de agregados sin orden y de alto peso molecular de GL-2045. Incluso más específicamente, un amortiguador de elución de 38-39 % de amortiguador b mantuvo específicamente la cantidad del homodímero presente en el producto de GL-2045 final, a la vez que también optimizaba las cantidades reducidas de los agregados sin orden.

(7) Las columnas de interacción hidrofóbica (HIC) pueden usarse para lograr perfiles de multimerización de GL-2045 específicos.

Los datos de la presente demuestran que se pueden usar múltiples HIC en las etapas de pulido para purificar GL-2045. Por ejemplo, el paso de flujo de la columna de Octilo FF contenía principalmente especies de alto peso molecular, lo que indica que esta columna puede usarse específicamente para retirar agregados de alto peso molecular de GL-2045. De manera alternativa, las columnas de butilo HP pueden usarse para separar la fracción de homodímero de las fracciones multiméricas para su aplicación, donde una de las fracciones puede lograr resultados más deseables. De manera alternativa, las columnas de HIC pueden usarse en modo de unión.

Protocolo de fabricación optimizado de GL-2045

En su conjunto, incorporando todos los parámetros descritos anteriormente, el siguiente protocolo resultó en el máximo rendimiento de proteína de GL-2045 a la vez que mantuvo el máximo porcentaje de la población total como multímeros.

Las células CHO se transfectaron con dos vectores usando un sistema de transfección patentado por ExcellGene SA (Monthey, Suiza), un vector de expresión de GL-2045 que comprende un casete de expresión de GL-2045 flanqueado por secuencias de direccionamiento de transposasa piggyBac y el segundo vector que comprende una transposasa piggyBac. El transposón piggyBac tiene inserción preferencial en regiones altamente transcritas del genoma y además contiene repeticiones terminales invertidas que proporcionan el aislamiento del silenciamiento génico. La transfección resultó en la integración del casete de expresión en regiones genómicas altamente transcritas estableciendo de este modo un banco de células CHO transfectadas de manera estable con menos de 20 inserciones de genoma del transgén. Las células CHO transfectadas de manera estable se cultivaron luego en un biorreactor con medio ActiCHO P a una temperatura de crecimiento de 37 °C. Durante este cultivo, las células recibieron diariamente ActiCHO Feed A y Feed B a una temperatura de crecimiento de 37 °C, hasta que los cultivos alcanzaron una densidad celular de alrededor de 10 millones a alrededor de 15 millones de células/mL. Luego de que se alcanzaron estas densidades, la temperatura de crecimiento cambió de 37 °C $\pm$ 1 °C a 32.5 °C $\pm$ 1 °C y GL-2045 fabricado de forma óptima del medio de cultivo se cosechó del medio el día final de cultivo.

Este protocolo resultó en una viabilidad celular mayor que 95 % el día 18 de cultivo y mayor que 80 % el día 21, y una titulación de proteína total final mayor que 9,000 mg/mL, donde más del 70 % de

GL-2045 estaba presente como no homodímeros y más del 30 % estaba presente como multímeros de orden superior por encima del quinto multímero.

GL-2045 se cosechó del sobrenadante de cultivo con un sistema de filtración de flujo tangencial que no obstruye el pasaje de los multímeros más grandes y de orden superior, reteniendo de este modo el perfil de homodímero y multímero del sobrenadante. Luego se emplearon métodos de fabricación corriente abajo para aislar GL-2045, para retirar impurezas y para aislar una fracción particular y así controlar el perfil de multímero de GL-2045 (por ejemplo, remoción de agregados de alto peso molecular sin orden). GL-2045 se purificó por cromatografía de afinidad de proteína A, donde el medio de proteína A se seleccionó por su capacidad de resistir la regeneración de alta alcalinidad. Además, se usó más de un amortiguador de lavado para permitir un control adicional sobre el proceso de purificación. Además, los procedimientos de CIP se realizaron más frecuentemente de lo normal y con un amortiguador de NaOH 0.5 M para retirar los multímeros de GL-2045 que se unen con avidez a la columna para poder regenerar completamente la capacidad de unión de la columna de proteína A según fuera necesario para retener el homodímero en la composición de GL-2045 final. GL-2045 se eluyó de la columna de proteína A con o sin un gradiente de elución de pH. Luego de la purificación por cromatografía de afinidad de columna de proteína A, se emplearon etapas de pulido adicionales. Se usó cromatografía de intercambio catiónico para retirar los agregados sin orden de alto peso molecular de GL-2045 con un amortiguador de elución que comprende 37-39 % +/- 0.5 % de amortiguador b, preferentemente con una resina CIEX POROS XS. En algunas modalidades, las columnas de HIC se usaron para purificar GL-2045 adicionalmente. Para retirar los agregados sin orden de alto peso molecular de GL-2045, se usó la resina Octilo FF como etapa de pulido adicional. De manera alternativa, las columnas que contienen butilo HP se usaron para aislar fracciones específicas de GL-2045 (por ejemplo, aislamiento de los multímeros de orden superior). Además, se usaron columnas de intercambio aniónico, específicamente Q Sepharose Fast Flow, como etapa de pulido adicional, particularmente en el modo de paso de flujo.

Si bien estas etapas de purificación adicionales pueden usarse individualmente, se prefería que la purificación de GL-2045 por cromatografía de afinidad de proteína A se usara en combinación con las tres de cromatografía de intercambio aniónico, intercambio catiónico e interacción hidrofóbica, para llegar a una sustancia de fármaco de GL-2045 final, donde la titulación de proteína final sea > 4 g/L, de los cuales >70 % de GL-2045 esté presente como multímero, donde >30 % de los multímeros sean multímeros pentaméricos o mayor.

Ejemplo 16 - Análisis de GL-2045 producido de forma óptima

Para caracterizar adicionalmente el GL-2045 producido de forma óptima por los métodos descritos en la presente, GL-2045 se produjo en un biorreactor de acuerdo con los métodos corriente arriba descritos en la presente usando el medio base ActiPRO, los suministros y los cambios de temperatura descritos en la presente. El sobrenadante de GL-2045 resultante se pasó luego a través de un filtro de profundidad Millipore X0HC seguido de filtración a través de un filtro de 0.2 μm y se procesó usando múltiples métodos de procesamiento corriente abajo. El perfil de multimerización de la composición de GL-2045 se evaluó después de cada etapa de procesamiento y se muestra en la Figura 33. El perfil de multimerización de la preparación de GL-2045 filtrada se muestra por los puntos rojos en la Figura 33. La preparación de GL-2045 filtrada se sometió luego a cromatografía de afinidad con proteína A MabSelect Sure (GE. n.º 11-0034-95) (perfil de multimerización mostrado por puntos azules en la Figura 33) y luego se purificó con ALEX en modo de paso de flujo usando la columna Q Sepharose Fast Flow. El pH del GL-2045 resultante se ajustó a pH 5.0 ± 0.10 y se filtró a través de un filtro de 0.2 μm (perfil de multimerización mostrado por puntos verdes en la Figura 33). El GL-2045 se purificó por cromatografía de intercambio catiónico usando la columna Poros XS en modo de unión por elución por etapas usando un amortiguador de elución que comprende 50 mM de NaAcetato + 375 mM de NaCl, pH 5.0 (perfil de multimerización mostrado por puntos amarillos en la Figura 33) antes de la cromatografía por interacción hidrofóbica (perfil de multimerización mostrado por puntos naranjas en la Figura 33) y filtración (perfil de multimerización mostrado por puntos púrpura en la Figura 33) para llegar a la sustancia de fármaco final (perfil de multimerización mostrado por puntos negros en la Figura 33). Los datos brutos de la Figura 33 se muestran en la Tabla 17 a continuación.

Tabla 17: Porcentajes de multímero determinados por HPLC analítica

	Procesamiento	Etapas	7+ mer	6 mer	5 mer	4 mer	3 mer	2 mer	Homodímero	Recipiente
5	HH RegTox Procesamiento 1	1 MabSelect carga	35.4	13.3	7.4	13.6	7.7	8.4	13.0	SUB
	HH RegTox Procesamiento 1	2 MabSelect grupo	35.7	12.7	7.4	13.9	7.4	9.6	13.4	SUB
10	HH RegTox Procesamiento 1	3 AEX Grupo	36.4	12.5	7.2	13.8	7.3	9.4	13.1	SUB
	HH RegTox Procesamiento 1	4 CEX Grupo	32.1	12.3	7.5	14.4	7.8	10.6	15.3	SUB
15	HH RegTox Procesamiento 1	5 HIC Grupo	31.7	12.4	7.4	13.7	7.4	10.8	16.6	SUB
	HH RegTox Procesamiento 1	6 UDFD Grupo	32.1	12.6	7.5	14.0	7.6	10.8	15.4	SUB
20	HH RegTox Procesamiento 1	7 DS	32.1	12.6	7.5	14.0	7.6	10.8	15.4	SUB
	HH RegTox Procesamiento 2	1 MabSelect carga	35.8	13.0	7.3	13.2	7.7	8.4	13.6	SUB
25	HH RegTox Procesamiento 2	2 MabSelect grupo	35.2	12.7	7.5	13.8	7.5	9.7	13.7	SUB
	HH RegTox Procesamiento 2	3 AEX Grupo	35.9	12.5	7.4	13.7	7.3	9.5	13.6	SUB
30	HH RegTox Procesamiento 2	4 CEX Grupo	30.8	12.3	7.7	14.4	8.1	10.9	15.8	SUB

5	HH RegTox Procesamiento 2	5 HIC Grupo	30.3	12.4	7.7	13.9	7.9	11.0	16.9	SUB
	HH RegTox Procesamiento 2	6 UFDF Grupo	31.8	12.3	7.7	14.0	7.9	10.9	15.4	SUB
	HH RegTox Procesamiento 2	7 DS	31.1	12.4	7.8	14.2	8.0	11.0	15.6	SUB
10	HH 100L Procesamiento 1	1 MabSelect carga	39.2	12.4	7.2	12.8	7.2	7.5	13.4	SS
	HH 100L Procesamiento 1	2 MabSelect grupo	38.8	12.3	7.3	13.1	7.0	8.1	13.5	SS
	HH 100L Procesamiento 1	3 AEX Grupo	37.7	12.4	7.3	13.3	7.1	8.3	13.9	SS
15	HH 100L Procesamiento 1	4 CEX Grupo	33.0	12.7	7.7	14.2	7.8	9.2	15.5	SS
	HH 100L Procesamiento 1	5 HIC Grupo	33.2	12.8	7.2	12.6	6.7	9.5	18.0	SS
	HH 100L Procesamiento 1	6 UFDF Grupo	33.9	12.9	7.5	12.9	6.8	9.5	16.6	SS
20	HH 100L Procesamiento 1	7 DS								SS
	HH 100L Procesamiento 2	1 MabSelect carga								SS
	HH 100L Procesamiento 2	2 MabSelect grupo	35.6	12.0	7.6	13.2	7.5	9.3	14.7	SS
30	HH 100L Procesamiento 2	3 AEX Grupo	35.4	11.9	7.6	13.4	7.6	9.4	14.7	SS

5	HH 100L Procesamiento 2	4 CEX Grupo	30.6	12.0	8.0	14.0	8.2	10.5	16.6	SS
	HH 100L Procesamiento 2	5 HIC Grupo	30.0	12.1	7.7	13.0	7.5	10.9	18.8	SS
	HH 100L Procesamiento 2	6 UDFD Grupo	30.6	12.3	7.9	13.2	7.7	10.9	17.5	SS
10	HH 100L Procesamiento 2	7 DS								SS
	HH 100L Procesamiento 3	1 MabSelect carga	34.5	12.7	8.0	13.6	7.6	9.2	14.4	SS
15	HH 100L Procesamiento 3	2 MabSelect grupo	36.1	12.4	7.8	13.2	7.4	9.2	13.9	SS
	HH 100L Procesamiento 3	3 AEX Grupo	36.0	12.4	7.7	13.3	7.4	9.3	14.0	SS
20	HH 100L Procesamiento 3	4 CEX Grupo	29.5	12.3	8.1	14.2	8.3	10.8	16.7	SS
	HH 100L Procesamiento 3	5 HIC Grupo	29.6	12.3	7.9	13.2	7.7	11.0	18.2	SS
25	HH 100L Procesamiento 3	6 UDFD Grupo	29.8	12.6	8.0	13.5	7.9	11.1	17.2	SS
	HH 100L Procesamiento 3	7 DS								SS
30	HH 250L Procesamiento	1 MabSelect carga								SUB
	HH 250L Procesamiento	2 MabSelect grupo	34.8	12.9	7.6	14.1	7.3	9.6	13.8	SUB

5	HH 250L Procesamiento	3 AEX Grupo	34.7	12.8	7.5	14.2	7.3	9.7	13.7	SUB
	HH 250L Procesamiento	4 CEX Grupo	29.5	12.7	7.8	15.0	8.0	11.0	15.9	SUB
	HH 250L Procesamiento	5 HIC Grupo	29.5	12.7	7.6	13.8	7.4	11.3	17.6	SUB
	HH 250L Procesamiento	6 UFDF Grupo	30.1	12.9	7.8	14.1	7.6	11.3	16.2	SUB
	HH 250L Procesamiento	7 DS								SUB
10	JJ GMP 1	1 MabSelect carga								SS
	JJ GMP 1	2 MabSelect grupo	33.6	13.17	7.54	14.66	7.22	9.49	13.88	SS
15	JJ GMP 1	3 AEX Grupo	34.80	12.70	7.50	14.60	7.20	9.30	14.00	SS
	JJ GMP 1	4 CEX Grupo	33.00	12.40	7.40	14.80	7.40	10.00	14.80	SS
	JJ GMP 1	5 HIC Grupo	31.80	12.90	7.40	14.10	7.00	10.30	16.50	SS
20	JJ GMP 1	6 UFDF Grupo	31.40	12.80	7.30	14.20	7.10	10.40	16.80	SS
	JJ GMP 1	7 DS	32.90	12.60	7.30	14.10	7.20	10.40	15.50	SS
	JJ GMP 2	1 MabSelect carga								SS
25	JJ GMP 2	2 MabSelect grupo	34.95	13.13	7.48	14.72	7.04	9.35	13.23	SS
	JJ GMP 2	3 AEX Grupo	34.40	12.80	7.40	14.90	7.20	9.50	13.80	SS
	JJ GMP 2	4 CEX Grupo	32.10	12.60	7.60	15.20	7.50	10.30	14.70	SS
30	JJ GMP 2	5 HIC Grupo	31.00	13.00	7.40	14.50	7.10	10.60	16.50	SS
	JJ GMP 2	6 UFDF Grupo	30.60	13.00	7.50	14.50	7.10	10.70	16.60	SS

5	JJ GMP 2	7 DS	31.60	12.60	7.40	14.30	7.10	10.60	16.40	SS
	JJ GMP 3	1 MabSelect carga								SS
	JJ GMP 3	2 MabSelect grupo	34.23	13.17	7.54	14.49	7.18	9.50	13.86	SS
	JJ GMP 3	3 AEX Grupo	34.20	13.00	7.50	14.50	7.20	9.60	14.00	SS
	JJ GMP 3	4 CEX Grupo	32.30	12.70	7.50	14.90	7.50	10.20	14.80	SS
10	JJ GMP 3	5 HIC Grupo	30.00	12.80	7.80	14.50	7.50	10.80	16.60	SS
	JJ GMP 3	6 UFDF Grupo	29.90	12.90	7.70	14.60	7.50	10.70	16.70	SS
	JJ GMP 3	7 DS	31.30	12.60	7.70	14.40	7.50	10.70	15.90	SS

15

Los porcentajes de las fracciones de homodímero, dímero, trímero, tetramero, pentámero, hexámero y 7+mer se evaluaron después de cada etapa por HPLC analítica. Brevemente, el sobrenadante de CHO transfectadas establemente con GL-2045 se generó de acuerdo con los métodos corriente arriba descritos en la presente. A continuación, GL-2045 se purificó de acuerdo con los métodos corriente abajo descritos en la presente. Las muestras se obtuvieron en las siguientes etapa sucesivas de purificación: Carga de proteína A MabSelect SuRe, grupo de Proteína A MabSelect SuRe, grupo de intercambio aniónico, grupo de intercambio catiónico, grupo de HIC, grupo de UFDF y sustancia de fármaco. Las muestras se compararon por SEC-HPLC analítica. Brevemente, la separación isocrática se realizó por HPLC usando dos columnas SEC (Agilent Bio SEC (300Å)) en serie con detección UV a 280 nm en un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento (sistema Agilent 1100 HPLC). La cromatografía se realiza con un tiempo de procesamiento de 60 minutos y una velocidad de flujo de 0.5 mL/min. Se calcula el porcentaje de área relativa de cada pico.

Los resultados se muestran en la Figura 33. Como es evidente en la Figura 33, el procesamiento corriente abajo de GL-2045 alteró los niveles de las fracciones más pequeñas, el homodímero y el dímero del homodímero, así como la fracción más grande, el 7-mer +, mientras que las fracciones 3-6 permanecieron bastante estables. Respecto de los multímeros más pequeños, las etapas de fabricación corriente abajo progresivas, de la carga de la columna de proteína A hasta la sustancia

de fármaco final, resultaron en un aumento de la recuperación del homodímero y el dímero del homodímero. Sin embargo, las etapas de procesamiento corriente abajo progresivas tuvieron el efecto contrario en los multímeros de orden máximo y resultaron en una reducción de sus porcentajes relativos.

- 5 El protocolo de fármaco GL-2045 resultante tuvo un patrón de multímero definido que comprendía, como porcentaje de la composición total, menos que alrededor de 20 % de homodímero y más que alrededor de 28 % del 7-mer y más. La composición también comprendía alrededor de 7-12 % de dímeros del homodímero, alrededor de 6-11 % de trímeros del homodímero, alrededor de 10-16 % del tetrámero del homodímero, alrededor de 6-9 % del pentámero del homodímero y alrededor de
- 10 10-14 % del hexámero del homodímero.